Tudor Branişte Valdur Saks

RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ

O METODĂ ORIGINALĂ DE CUANTIFICARE A MODIFICĂRILOR FUNCȚIONALE LA CORDUL UMAN

asiliana '98

Tudor Branişte

Valdur Saks

RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ. O METODĂ ORIGINALĂ DE CUANTIFICARE A MODIFICĂRILOR FUNCȚIONALE LA CORDUL UMAN

Scanned with OKEN Scanner

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
BRANIŞTE, TUDOR
Respirația mitocondrială: o metodă originală de cuantificare a modificărilor funcționale la cordul uman / Tudor Branişte, Valdur Saks. - Iaşi: Vasiliana '98, 2012
Bibliogr.
ISBN 978-973-116-243-0

I. Valdur, Saks

616-127-007.64-076

BIBLIOTECA JUDETEANA „GH.ASAC..."

Editura **Vasiliana '98 – acreditată CNCS**
Tel: 0332421250
e-mail: vasi98iasi@yahoo.com
www.vasiliana98.ro

Redactor: *Florentin Busuioc*

Apărut 2012
Iaşi – România

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

LISTA ABREVIERILOR

ACI– indicele acceptor de control (ACI) controlul calității
ACR – indexul de control al acceptorului
ADP – adenozin difosfat
AMP – acid adenozinmonofosfat
AMPc – adenozinmonofosfat ciclic
ANT – adeninnucleotid-translocaza
ATP – adenozin trifosfat
BB – izoformacerebrală
BSA – ser de albumină bovină
CF III-IY NYHA – ClasaFuncționalăAsociațiaCardiologilornew-york-eze
C_r – creatină
C_rC_{mit}–creatinamitocondrială
$C_rK(C_rC_m)$ – creatinchinazamicrofibrilară
DASPMI – iodură de metil n-piridil (p-dimetilaminostiril)
RMN – rezonanța magnetică nucleară
EGTA – acid etilenglicol tetraacetic
ES – celule țintă

FAD^+ – flavine adeninedinucleotide
GLU – glutamat
HC – hexochinaza
IMM –mitocondriileintermiofibrilare
KLUM –kinaza lanțurilor uşoare de miozină
K_M / Km – kalmodulin
CRP – chinaza protein-înrudită
MAL – malat de scos
MAP – proteinele microtubulare
MB – izoformahibridă
MM – izoformamusculară
NAD^+ – nicotinadenine dinucleotide
NAD(P)H – nicotinamidă adenin dinucleotid fosfat-oxidaza
NADH – nicotinamidaadeninDinucleotida
NADP –nicotinamida adenin dinucleotida fosfat
OC – octanoilcarnitină
PBS – fosfat tamponat salin
PBS – sare de fosfat
PBS – sare de fosfat
PC_r – fosfocreatină
PC – piruvatchinaza
P_i – fosfat anorganic
REP – rezonanțaelectronicăparamagnetică
RMN – rezonanța magnetică nucleară
RNA – acidul ribonucleic
RS – reticul sarcoplasmic
SH – grupareacisteinei

Scanned with OKEN Scanner

SSM – mitocondriilesubsarcolemale
T – translocaza
TTFB – tetracloro-trifluorometilbenzimidazol
VC_r – viteza de sintetizare a fosfocreatinei
VDAC – pori mitocondriali
V*max* (DW) – viteza maximă
CMD – cardiomiopatie dilatativă
CMI – cardiomiopatie idiopatică
FCD – cardiomiopatie familială
PCR – reacția de polimerizare în lanț
TNF – factor de necroză tumorală
HLA –antigen leucocitar uman
ADN–Acid dezoxiribonucleic
BNP – peptidul natriuretic
ECG – electrocardiograma

Scanned with OKEN Scanner

AVERTISMENT

Ne-am propus, în paginile acestei cărți, să valorizăm rezultatele cercetărilor noastre cu privire la o problemă ***fundamentală***, din domeniul științelor medicale, aflată în atenția analitică a unor personalități reprezentative ale lumii.

Tema, din care ne-am făcut – şi noi – un obiect de interes şi de un îndelung studiu, este: **Respirația mitocondrială. O nouă metodă originală de cuantificare a modificărilor funcționale la cordul uman**. Această temă, care constituie obiectul investigației noastre, este, astăzi, tot mai aproape de căutările şi cuceririle științei medicale contemporane, a străbătut, în procesul ei evolutiv, interpretări diferite şi a utilizat metode dintre cele mai diverse, care, apreciate axiologic, au marcat date importante în istoria exegezei științifice.

Raportând-o la întregul din care face parte, la conexiunile ei structurale cu alte probleme adiacente, dorim să punem în lumină, prin îmbinarea metodei descriptive cu demersul analitic şi interpretativ, bogăția diversificată şi

Scanned with OKEN Scanner

complexitatea acestei teme, atât de importantă, prin multitudinea semnificațiilor ei științifice şi înalt morale.

Exegeza științifică a deschis, de multă vreme, capitolul cunoaşterii şi interpretării problemei metabolismului, valorificând, într-o bogată bibliografie, dimensiunile şi semnificațiile reale. Cu toate acestea ea a rămas, susceptibilă la noi abordări şi luări de poziții, mai ales, sub raportul metodelor de investigație. Pluralismul interpretărilor aparține actului exegetic şi constituie o condiție a progresului științelor lumii.

Din vastitatea şi bogăția materialului existent, într-un spațiu, voit restrictiv, ne-am circumscris obiectul investigației doar la descoperirea şi valorificarea – în practica medicală – a unei noi metode de cercetare, care permite cuantificarea modificărilor funcționale, la nivel subcelular, cu justificată precădere, a stării mitocondriale şi a eficacității funcționării creatinkinazei mitocondriale; suntem încredințați că, perspectivele deschise – în acest fel – obiectivului urmărit sunt dintre cele mai oportune şi utile.

Preluând toate elementele pozitive din cercetările anterioare, la care am adăugat rezultatele muncii noastre de documentare şi proprietățile viziunii noastre personale asupra problemei, am încercat să continuăm un proces de

Scanned with OKEN Scanner

investigație început, cu intenția, mărturisită, de a deschide o nouă cale în cercetarea științifică, prin folosirea acestei metode, de abordare și interpretare, pe care o considerăm, fără falsă modestie, una originală – unică, în exegeza științifică mondială.

Metoda descoperită, după îndelungi investigații de laborator, ceea ce face posibilă utilizarea ei și în clinică, își întemeiază rațiunea existenței pe convingerea că, în destinul ei activ, ea poate fi deschizătoare de noi direcții ale cunoașterii și acțiunii analitice.

Logica temei și a finalității ei ne-a determinat să segmentăm conținutul lucrării în mai multe capitole, cu titluri explicative, care, la prima vedere, par studii de sine stătătoare, dar, în realitate, ele se subsumează întregului și converg, toate, spre aceeași finalitate.

În *primul capitol*, **Transportul intracelular al energiei pe calea fosfocreatinei,** după fixarea datelor programatice ale întreprinderii noastre, fără să avem pretenția unei sinteze a istoricului temei sau a evaluării foloaselor abordării acesteia, încercăm, în aceste pagini introductive, de considerații generale, să aruncăm o privire de ansamblu asupra problematicii propuse spre dezbatere în cuprinsul cărții de față, pe care o

Scanned with OKEN Scanner

considerăm, cu atât mai necesară, cu cât o cercetare, întreprinsă pe capitole distincte, este, în mod obligatoriu, fragmentată.

Cel de-*al doilea capitol*, **Tehnica celulelor permeabilizate şi a fibrei în investigaţiile privind funcţia mitocondrială** *in vivo*, este consacrat descrierii metodei, cu motivaţia descoperirii ei şi înfăţişările pe care le poate lua atunci, când este aplicată în practica medicală.

În cel de-*al treilea*, **Afectarea ischemică acută şi problemele conservării inimii** subliniem evoluţia valorică a metodei noastre de investigaţie, prin aplicarea ei în ischemie şi în posibilitatea conservării inimii.

Această valorificare a metodei în cercetarea cardiomiopatiilor, în cazul insuficienţei cardiace şi hipertrofiei, alcătuieşte conţinutul celui de-al *patrulea capitol*, **Cardiomiopatii.**

Un scurt *final* încheie lucrarea, cu încercarea de a arunca o privire sintetică, integratoare, asupra problemei, cu intenţia de a ajunge la o apreciere de ansamblu a obiectului cercetării noastre şi la fixarea, printr-o judecată critică dreaptă, a noutăţii şi utilităţii descoperirii noastre. Ea poate deveni – suntem convinşi – un factor de înnoire a investigaţiei ştiinţifice şi un necesar iniţiator de programe / proiecte.

Scanned with OKEN Scanner

Lucrarea noastră, *nu* constituie, se înțelege, un *act încheiat*. Ea reprezintă, doar un moment din evoluția cercetărilor medicale, cărora le vom consacra, şi noi, de aici înainte, capacitățile intelectuale şi puterea noastră de muncă.

O ***bilbiografie*** *(selectivă)* organizează, după criteriul alfabetic, cele mai importante scrieri din domeniu.

Autorii

Am anexat, la sfârşitul volumului, câteva studii complementare, care reiau şi aprofundează aspecte clinice, dintre cele mai importante, ale temei noastre de cercetare.

Scanned with OKEN Scanner

AVERTISMENT

This book is focused upon the assessment of the results of our research dealing with a *fundamental* problem in the sphere of medical science which received attention on part of some most prominent personalities in the field.

The *topic* that we have assumed as a sphere of interest and an object of a long-lasting study is **Mitochondrial respiration. A new original method of quantification of functional modifications in human heart.** This subject, being in the centre of our attention, is now drawing closer to the research and achievements of modern medicine; it has undergone evolution and various interpretations, using most diverse methods which, being appreciated axiologically, marked some important dates in the history of scientific research.

By means of relating the subject to the whole issue, as well as to its structural connections with other adjacent problems, we are aimed at highlighting, with the help of combining the descriptive method with analytical and

Scanned with OKEN Scanner

interpretative ones, the rich diversity and complexity of the topic which seems to us extremely important because of its considerable scientific and moral significance.

Scientific research has long opened the chapter of learning and interpreting the issue of metabolism, assessing its real dimensions and significance in a rich bibliography. However, it remained receptive to new approaches and opinions, especially as far as research methods are concerned. The pluralism of interpretations belongs to the exegetic act and constitutes a condition for the progress of the world science.

The existent material in this intentionally restrictive sphere is vast; however, what we deal with in our research is only discovering and assessing a new method of research in medical practice which makes possible a quantification of functional modifications at the subcellular level, especially the mitochondrial state and the efficiency of the functioning of mitochondrial creatine kinase; we believe that the open perspectives of the pursued objective are most favourable and helpful.

Borrowing all the positive elements from previous studies and adding to them the results of our documentation work, as well as our personal vision of the problem, we try to continue the

Scanned with OKEN Scanner

process of research which has been undertaken with a view to open a new road in scientific study by means of applying this method of approach and interpretation which we consider, without any false modesty, to be an original one – and even unique in the modern scientific research.

The discovered method, long studied in the laboratory – the fact that makes it possible to be used in clinics – implies the idea that during its active existence it can open new directions of analytical learning and analysis.

The logic of the topic and its finality determined us to divide the content of the work in several chapters with explanatory titles that, at first sight, seem to present independent studies, but in reality they are subject to the whole and pursue the same goal.

In the *first chapter*, **Intracellular transport of energy through phosphocreatine,** after fixing the data related to the subject of our research, with no intention to offer a synthesis of the state of the art in the sphere or to evaluate its approaches, we try, by means of general introductory considerations, to present an overall vision of the issue we discuss in this book; we consider it to be an important part of the present study as a part of an obligatory fragmentary research divided into chapters.

Scanned with OKEN Scanner

The *second chapter,* **The technique of permeabilized cells and fiber in research dealing with mitochondrial function** *in vivo,* is devoted to the description of the method, including the motivation of its discovery and the form it may take when applied in medical practice.

The *third chapter,* **Acute ischemic affection and the issue of heart protection** highlights the value evolution of our scientific method by means of applying it to ischemia and the possibility of heart protection.

This assessment of the method in studying cardiomiopathy in the case of cardiac failure and hypertrophy is contained in the *fourth chapter,* **Cardiomiopathy.**

A short ***conclusion*** is the last part of the book; its aim is to look at the issue synthetically and integratively, with a view to reach the general assessment of the subject of our research and to state the novelty and usefulness of our discovery by means of a critical and fair analysis. We are convinced that this discovery can become a renewing factor in scientific research and a necessary initiator of programmes / projects.

Our work does ***not,*** obviously, ***exhaust the subject,*** representing just one moment of the evolution of medical research to which we shall

Scanned with OKEN Scanner

devote our intellectual capacities and hard work in future.

A selective ***bibliography*** organizes the most important volumes in the field in the alphabetic order.

The authors

At the end of the volume we added several complementary studies which return to some clinical aspects (the most important ones in our sphere) and look at them more closely.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 1

TRANSPORTUL INTRACELULAR DE ENERGIE: CALEA FOSFOCREATINEI

1.1. INTRODUCERE

Eforturile esențiale ale unor bioenergeticieni de renume continuă să fie dirijate – în perioada actuală – spre studierea mecanismului extrem de complex al fosforilării oxidative mitocondriale. Cercetările au devenit deosebit de active după enunțarea teoriei chemiosmotice de conjugare a oxidării mitocondriale cu sinteza *ATP* de către P. Mitchell şi prezentarea de către V. Skulachev & E. Liberman *et al.* a probei experimentale cu privire la existența unui potențial membranar în mitocondrii [225, 261, 262]. Literatura de specialitate acordă, de asemenea, o mare atenție studierii mecanismului contracției musculare, precum şi mecanismelor moleculare (atât ale reacției actomiozinice, cât şi ale reacțiilor *ATP*-azice membranare ce asigură transportul activ al ionilor prin membrana

Scanned with OKEN Scanner

reticulului sarcoplasmic şi prin membrana superficială a celulelor [5, 244, 249, 318,377, 421]).

Timp îndelungat s-a considerat că între aceste procese – producerea *ATP*-ului în mitocondrii şi utilizarea lui în procesele energo-dependente extramitocondriale – în celule, inclusiv în cele musculare – există o legătură extrem de simplă, realizată prin difuziunea adeninucleotidelor *ATP* şi *ADP* [6, 282]. Însă, cercetările efectuate în laboratoare din diverse țări ne determină să reconsiderăm opiniile existente privitoare la mecanismul de transport intracelular al energiei în muşchi, în special în inimă, pentru care este realizată majoritatea investigațiilor acestui proces. Conform rezultatelor acestor investigații, cantitatea principală de energie se transferă de la mitocondrii la locurile ei de utilizare, în miofibrile şi în sistemele membranare extramitocondriale, de către moleculele de fosfocreatină, prin concursul diverşilor izofermenți ai creatinkinazei. În lucrarea de față sunt analizate datele experimentale, ce demonstrează rolul central al sistemelor creatinkinazei în procesul transportului intracelular de energie în muşchi precum şi în reglarea metabolismului energetic şi a contracției inimii.

Scanned with OKEN Scanner

1.2. METABOLISMUL ENERGETIC AL CELULEOR MUSCULARE

Conform parametrilor biochimici şi funcționali principali (*caracterul aerob al metabolismului energetic, activitatea relativ redusă a ATP-azei miozinei şi evoluția relativ lentă a contracției*), celulele musculare ale inimii – cardiomiocitele – sunt similare cu celulele mușchilor scheletici roșii și se deosebesc de celulele mușchilor scheletici albi rapizi, mai adaptați la metabolismul anaerob și capabili de o evoluție rapidă a contracției [22, 178]. Miocardul, ca și mușchii scheletici roșii, se caracterizează prin creșterea lineară a vitezei de absorbție a oxigenului de către celule și prin sporirea sarcinii și volumului de activitate realizată [124]; totodată, conținutul intracelular de fosfocreatină şi *ATP* se modifică nesemnificativ: intensificarea utilizării lor, la contracții, se compensează prin accentuarea sintezei lor în mitocondrii, datorită existenței, în aceste celule, a sistemului eficient de legătură inversă dintre contracție și fosforilarea oxidativă mitocondrială [276, 427]. Parametrii biochimici caracteristici ai metabolismului energetic al inimii de șobolan și de iepure, perfuzate și izolate, sunt prezentați mai jos [276, 278, 426]:

Scanned with OKEN Scanner

- ✧ ***Conținut*** *mcr moli/g țesut umed*
- ✒ *ATP* *4 – 5*
- ✒ *ADP* *1 – 1,2*
- ✧ Fosfat anorganic *3*
- ✧ Fosfocreatină *6 – 9*
- ✧ Creatină *4 – 6*
- ✧ Viteza de absorbție a oxigenului *de la 50 la 200 mcrg-atom pe1min*

Ca urmare a unei echilibrări atât de exacte, între procesele, relativ lente, de utlizare și producere a energiei [4, 17,] (*prin producerea de energie se subînțelege sinteza intracelulară a ATP-ului*), intensitatea reacțiilor metabolismului energetic este determinată de însuși procesul de contracție, care, la rândul său, este controlat de procesele conjugării electromecanice [108, 210].

În muşchii scheletici albi, rapizi, o asemenea echilibrare între utilizarea şi producerea energiei lipseşte şi evoluția rapidă, efemeră, a contracției (*a cărei capacitate este legată de activitatea ATP-azică ridicată a miozinei acestor celule*) este însoțită de disocierea rezervelor intracelulare de fosfocreatină şi de acumularea de lactat [76, 201]. După o perioadă scurtă de travaliu, aceşti muşchi au nevoie de un scurt timp de repaus, în cursul căruia lactatul se oxidează în mitocondrii (fenomenul *„datoriei de O_2"*) şi se refac rezervele intracelulare

Scanned with OKEN Scanner

de fosfocreatină. În metabolismul energetic al acestor celule, un rol important îl joacă disocierea glicolitică a glucidelor în citoplasmă – ***glicoliza anaerobă***. Ca urmare, activitatea fermenților glicolitici din celulele mușchilor albi depășește de câteva ori activitatea lor din celulele miocardului sau ale mușchilor scheletici roșii [178]. Iar cantitatea de mitocondrii în mușchii scheletici albi este semnificativ mai redusă [56]. Diferențele de natură dintre procesele principale de producere și caracteristicile cantitative ale contracției duc la un nou aspect calitativ al corelațiilor dintre procesele de utilizare și de producere a energiei în mușchii scheletici albi, spre deosebire de mușchii roșii sau de miocard.

Caracterul aerob al metabolismului energetic al miocardului se reflectă în ultrastructura specifică a celulelor cardiace. În cardiomiocite, aproximativ 30-40% din volum aparțin mitocondriilor, dispuse în serii, între miofibrile, care ocupă circa 50% din volumul celular, restul spațiului fiind ocupat de reticulul sarcoplasmic, de nucleu și citoplasmă [56, 146, 222]. Pentru inima aerobă, ca și pentru mușchii scheletici roșii, substraturile energetice principale sunt acizii grași, glucoza, lactatul, piruvatul și corpii cetonici, care intră în celule din plasma sangvină precum și, într-o mai mică măsură, aminoacizii [277, 427]. Chiar în

Scanned with OKEN Scanner

prezența hidraților de carbon, substanțele preponderente rămân acizii graşi, pentru oxidarea cărora se consumă circa 70% din oxigenul utilizat de inimă [37, 277], restul de 30% fiind întrebuințat pentru oxidarea hidraților de carbon [277, 288]. Sistarea intrării oxigenului în inimă duce la suspendarea oxidării acizilor graşi şi la activarea glicolizei anaerobe, care, totuşi, nu asigură producerea *ATP*-ului în cantitatea necesară pentru susținerea contracției inimii. În aceste condiții, capacitatea contractilă a miocardului scade rapid [91, 277, 278]. În inima aerobă, care funcționează în stare de efort, până la 70% din energia produsă este consumată în contracții, restul de 30% fiind folosit pentru susținerea transportului activ al ionilor de calciu în reticulul sarcoplasmic, al sodiului, potasiului şi, de asemenea, al calciului prin membrana sarcolemală (*superficială*) a celulelor, precum şi în reacțiile biosintetice ori în alte reacții energo-dependente [288, 289].

1.2.1. Reglarea metabolismului oxidativ în inimă

Viteza de absorbție a oxigenului (*viteza de transfer al electronilor pe lanțul respirator*) de către mitocondrii este determinată în mod direct de mărimea diferenței transmembranare a

Scanned with OKEN Scanner

potențialului electrochimic al protonilor $\Delta\mu_{H+}$ [261, 262]. La utilizarea energiei $\Delta\mu_{H+}$ pentru fosforilarea *ADP* (*după un mecanism încă neelucidat*), potențialul membranar se reduce, ceea ce face ca această modificare să fie urmată de o stimulare semnificativă a transferului de electroni şi a absorbției de oxigen [426] - este întocmai fenomenul de control respirator, descris de către B. Chance &G. R. Williams, încă din anul 1956 [70]. În aceste condiții, accesibilitatea *ADP*-ului în matricea mitocondriilor reprezintă factorul cinetic ce influențează mărimea potențialului membranar şi care determină viteza de absorbție a oxigenului. Membrana interioară a mitocondriilor este impermeabilă pentru nucleotide, ca şi pentru intermediarii ciclului acizilor tricarbonici, care se transferă prin această membrană, cu ajutorul unor transportori specifici [193]. Transportorul adeninnucleotidelor translocazei *ATP-ADP* este, dintre aceştia, cel mai bine studiat. Translocaza *ATP-ADP* posedă o înaltă specificitate şi transportă, cu o evidentă viteză, numai *ATP* şi *ADP* [411]. Schimbul prin translocază al adeninnucleotidelor intramitocondriale cu cele extramitocondriale se realizează în raport stoichiometric de 1:1 [194, 411]. Transferul *ATP*-ului din mitocondrii în schimbul *ADP*-ului extramitocondrial reprezintă primul stadiu cheie al

Scanned with OKEN Scanner

transportului intracelular de energie şi, totodată, veriga centrală în reglarea fosforilării oxidative. Acest schimb se realizează de către proteina transportoare cu o masă moleculară de 30.000 *Daltoni*, care există în membrana mitocondrială, probabil, în formă dimeră [196] (60.000 *Daltoni*). Transportul de *ATP*şi *ADP* are un caracter absolut electrogen, întrucât aceştia se transferă, în genere, sub forme complet ionizate: ATP^{4-} şi ADP^{3-} [195]. De aceea, la energizarea membranei – prin apariţia potenţialului membranar cu semnul „*minus*" în matricea mitocondriilor – se evidenţiază caracterul anizotrop al schimbului, adică transportul preponderent de *ADP* în mitocondrii, în schimbul produsului de fosforilare oxidativă – ATP –, cu utilizarea unei părţi din energia potenţialului membranar [195, 371, 411]. Este binecunoscut faptul că transferul nucleotidelor este însoţit de modificări conformaţionale în molecula proteică a transportorului [194, 411], dar mecanismul exact al transferului de *ATP* şi *ADP* nu este stabilit încă. Desigur, au apărut comunicări despre faptul că în unele stadii ale transferului este necesară o fixare concomitentă a nucleotidelor extra- şi intra-mitocondriale (la formarea complexului de substrat proteic ternar), ceea ce duce la ideea funcţionării translocazei în conformitate cu mecanismul „ping-pong- *ului*" [23, 99].

Scanned with OKEN Scanner

O problemă importantă şi nerezolvată până în prezent este cea a factorilor concreţi ce determină viteza de absorbţie a oxigenului în celule [426, 427] şi a acelor mecanisme care asigură legătura inversă, eficientă, dintre contracţie şi fosforilarea oxidativă mitocondrială în celulele musculare, inclusiv în celulele cardiace. Există unele puncte de vedere contradictorii în problema reglării celulare a vitezei respiratorii mitocondriale, divergenţele principiale constând în evaluarea naturii stadiului de limitare a vitezei (*dacă translocaţia de ATP şi ADP cunoaşte sau nu un asemenea stadiu*).

Unii cercetători consideră că principalii factori regulatori sunt: potenţialul fosfatic extramitocondrial $log\{[ATP] / ([ADP][P_i])\}$, privit ca un echilibru termodinamic cu reacţiile din lanţul respirator, în primele două puncte de conjugare, şi cinetica transportului de electroni de la citocromii aa_3 la oxigen; acest grup neagă rolul translocazei în reglarea respiraţiei mitocondriale (*translocaţia este considerată ca un proces rapid ce stabileşte echilibrul dintre nucleotidele intra- şi extra- mitocondriale*) [153, 428].

În acelaşi timp, există numeroase date obţinute *in vitro*, ce demonstrează că stadiul transferului de adeninnucleotide este departe de a

Scanned with OKEN Scanner

fi echilibrat şi limitează viteza de fosforilare oxidativă [219, 417].

Demn de subliniat este şi faptul că s-au obținut, în câteva laboratoare, probe experimentale deosebit de precise [85, 86, 219, 417]. În special J. J. Lemaster şi A. E. Sowers au demonstrat că, la orice concentrație de fosfat, adaosul unor mici cantități de inhibitor al translocazei atractilozidei în mediu, care inhibă doar o mică parte din moleculele translocazei, este acompaniat de reducerea vitezei de fosforilare oxidativă mitocondrială; în plus, gradul de inhibare a respirației a fost direct proporțional cu cantitatea atractilozidei fixate [219]. Cercetările termodinamice asupra procesului de transfer al adeninnucleotidelor prin membrana mitocondrială internă au evidențiat, de asemenea, că acest proces este departe de starea de echilibru [417]. Aceste date demonstrează, destul de univoc, faptul că viteza de transfer de *ADP* din mediul extramitocondrial în matricea mitocondriilor este un stadiu vitezo-determinant (*şi prin urmare, reglator*) în reacția generală de fosforilare oxidativă a *ADP*-ului extramitocondrial [86, 219, 426]. În celulele intacte, participă, probabil, la reglarea fosforilării oxidative, sisteme ce asigură concentrația citoplasmatică de *ADP* sau concentrația *ADP*-ului, accesibilă translocazei.

Scanned with OKEN Scanner

Acest proces, precum şi realizarea conexiunii dintre contracție și fosforilarea oxidativă mitocondrială, cum vom demonstra în cele ce urmează, sunt strâns legate de transferul intracelular de energie.

1.3. PROBLEMA TRANSPORTULUI INTRACELULAR DE ENERGIE ÎN CELULELE MUSCULARE

Opiniile privind relația dintre procesele de producere și utilizare a energiei prin intermediul sistemului intracelular al adeninnucleotidelor s-au conturat ca urmare a rezultatelor excelente obținute în studierea fosforilării oxidative mitocondriale și a contracției musculare. Nu există nici un dubiu că atât contracția, cât și procesele de transport al ionilor, se bazează pe folosirea energiei de *ATP* [244, 318, 377, 421]. Este bine cunoscut şi faptul că în celulele cerebrale, conținutul de *ATP* depinde și de conținutul altui compus macroergic – al fosfocreatinei, prezentă în celule într-o concentrație ridicată [106]. În cadrul concepției amintite *supra*, se susține că legătura dintre *ATP* și fosfocreatină se realizează prin starea de echilibru a reacției creatinkinazei în citoplasma celulelor și că fosfocreatina sintetizată numai din *ATP*-ul citoplasmatic reprezintă un tampon

Scanned with OKEN Scanner

energetic ce servește la stocarea energiei într-o formă care poate fi utilizată pentru resinteza rapidă a *ATP*-ului, pe seama transformării reacției creatinkinazei echilibrate prin creșterea sarcinii [56, 282, 427]. La prima vedere, o asemenea abordare a permis să se pună punct discuției în istoria complexă a studierii rolului *ATP*-ului şi al fosfocreatinei în contracția musculară. Fosfocreatina a fost descoperită şi izolată din mușchi în anul 1927, iar *ATP*-ul – în 1929 [106]. În 1931, a fost publicată celebra lucrare a lui E. Lundsgaard, efectuată pe baza mușchilor anaerobi, intoxicați cu iodacetat, mușchi în care glicoliza (*formarea lactatului*) a fost complet inhibată [243]. În respectiva lucrare s-a demonstrat continuarea contracției mușchiului la o inhibare completă a producerii lactatului, fapt ce a combătut teoria lactatică a contracției, acceptată până atunci [265]). În același timp, s-a demonstrat că şi contracția este legată de scăderea conținutului de fosfocreatină, considerată drept un substrat energetic direct al contracției [265]. Totuși, după descoperirea de către K. Lohman, în 1934, a reacției de creatinkinază în mușchi, s-a dovedit că fosfocreatina poate fi folosită numai în prezența adeninnucleotidelor, şi, ca atare, nu reprezintă un substrat energetic nemijlocit, ci se folosește pentru fosforilarea *ADP*-ului și sinteza *ATP*-ului [237]. În 1939, W. Engelhardt şi colaboratorii au evidențiat

Scanned with OKEN Scanner

prezența acțiunii *ATP*-azice a miozinei [105], iar, ulterior, lucrările lui A. Szent-Georgy au demonstrat, în mod indiscutabil, prezența *ATP*-ului în contracțiile gelului actomiozinic și ale miofibrilelor glicerinate [376].

Cu toate acestea, indiferent de aplicarea unor metode foarte precise de măsurare, nu s-a reușit, o lungă perioadă, să se înregistreze utilizarea *ATP*-ului în mușchii care se contractă [265]. La analiza modificărilor biochimice produse în mușchi, în timpul contractării lor, în condițiile inhibării reacțiilor de producere a energiei (*condiții anaerobe, 0° C*), conținutul de *ATP* rămânea totdeauna constant, dar, în același timp, se observa scăderea continuă a conținutului de fosfocreatină, scădere echivalentă cu travaliul și cantitatea de căldură degajată [67, 265]. Dezacordul dintre datele obținute în experimentele cu proteine contractile izolate și pe mușchi intact, a fost soluționat abia în anul 1962, de către R. E. Davies *et al.* Aceştia au folosit *1*-fluor-*2,4*-dinitrobenzol pentru inhibarea selectivă a creatinkinazei în mușchii scheletici de broască; în asemenea condiții, contracția mușchiului este însoțită de disocierea energetic echivalentă a *ATP*-ului, la un nivel constant de fosfocreatină și de creatină [64, 159]. Aceste date au fost confirmate ulterior de către alți autori și, odată cu rezultatele studierii proteinelor contractile izolate, s-a demonstrat atât rolul primar al *ATP*-

Scanned with OKEN Scanner

ului cât şi rolul secundar al fosfocreatinei în contracţia musculară [265].

Aceste date, în principiu, importante, stabileau, însă, doar succesiunea reacţiilor care se produc direct în locurile de utilizare a energiei şi, în nici un caz nu permiteau să se tragă o concluzie despre forma în care energia se transportă din mitocondrii la locurile de utilizare (*cu toate acestea, concluzia a fost formulată, fără ezitare, în favoarea ATP-ului*). În aceeaşi serie de experimente s-au obţinut şi alte date, care merită o atenţie deosebită. S-a demonstrat că, în condiţiile inhibării producerii de energie, muşchiul, la o stimulare electrică, se poate contracta de 50-100 de ori şi-şi pierde capacitatea de contracţie doar la disocierea completă a fosfocreatinei [67, 160]. Totuşi, în experimentele în care creatinkinaza a fost inhibată cu *1*-fluor-*2,4*-dinitrobenzol, contracţia, la stimularea electrică, s-a repetat doar de 4-5 ori, după care muşchiul şi-a pierdut capacitatea de a se contracta; dar, după o perioadă oarecare de repaus, muşchiul răspundea, din nou, la excitaţia periodică cu câteva cicluri de contracţie [159, 160]. În acest fel, autorii au ajuns la concluzia că moleculele de *ATP* în celulele musculare posedă o mobilitate limitată şi este necesară o perioadă de repaus între contracţii, pentru difuziunea unor noi cantităţi de *ATP* din mioplasmă spre centrele active ale miozinei [64, 159, 160]. Date similare au

Scanned with OKEN Scanner

fost obținute de către G. Gerken şi U. Schlette pe o inimă izolată de iepure: în experimentele lor, contracția inimii s-a întrerupt în prezența *1*-fluor-*2,4*-dinitrobenzol, la un nivel constant de fosfocreatină, când conținutul de *ATP* s-a redus cu numai 15-20% [121]. Dacă presupunem că *1*-fluor-*2,4*-dinitrobenzol inhibă, mai mult sau mai puțin selectiv, doar reacția creatinkinazică [265], atunci această constatare relevă că numai un procent mai mic de 20% din *ATP*-ul celular în miocard este accesibil pentru utilizarea directă în actul contracției.

Date similare, atât sub raport cantitativ, cât și calitativ, au fost obținute în studierea modificărilor biochimice din miocardul infarctizat și în cel ischemic [91, 135]. Prin întreruperea accesului oxigenului la celule, contracția miocardului se întrerupe în curs de 0,5-1 min; odată cu contracția, se reduce cantitatea de fosfocreatină, după un minut în celule rămânând circa 10% din nivelul ei inițial. Conținutul de *ATP* în celule se reduce, totuşi, nesemnificativ şi în momentul stopării contracțiilor, el reprezintă 80-85% din conținutul inițial de *ATP* [135, 278]. Exact aceleași date au fost obținute de către M. W. Seraydarian şi colaboratorii, pe o cultură de celule musculare, când, în loc de întreruperea alimentării celulelor cu oxigen, fosforilarea oxidativă a fost inhibată cu oligomicină [364, 365].

Scanned with OKEN Scanner

Suntem în imposibilitatea de a explica toate aceste rezultate, dacă admitem că *ATP*-ul este transportor de energie (*în ultimul caz, funcția contractilă trebuie să fie perturbată numai după epuizarea ATP-ului*). În baza informațiilor obținute, s-a ajuns la concluzia compartimentării *ATP*-ului în celule. Aceste date au fost incluse în titlul uneia dintre primele lucrări din această serie a lui S. Gudbjarnason *et al.*, în anul 1970 [135]. Probabil doar un mic procent din *ATP*-ul localizat lângă miofibrile și membranele celulare poate fi folosit direct și cu mare viteză la contracții și la transportul activ de ioni; cea mai mare partea *ATP*-ului, remanentă (din cauza mobilității limitate a moleculelor de ATP în mediul intracelular cu un sistem structural superior), este localizată în alte secțiuni ale celulei și nu este folosită la contracții [121, 135, 363]. Reducerea conținutului de fosfocreatină, paralelă cu diminuarea forței de contracție, a permis unor autori să presupună că transportul intracelular de energie (*legătura dintre diferitele fracțiuni de ATP*) poate fi realizat de către fosfocreatină, cu aportul diverselor creatinkinaze [135, 363]. În felul acesta, rezultatele experimentale obținute au pus problema mecanismului transportului de energie în celulele musculare și a rolului sistemelor creatinkinazice în acest proces. La supoziția participării active a creatinkinazei în transportul intracelular de energie au ajuns și

Scanned with OKEN Scanner

cercetătorii care au studiat reacția creatinkinazei [33, 167], iar investigațiile efectuate ulterior au confirmat justețea acestei ipoteze.

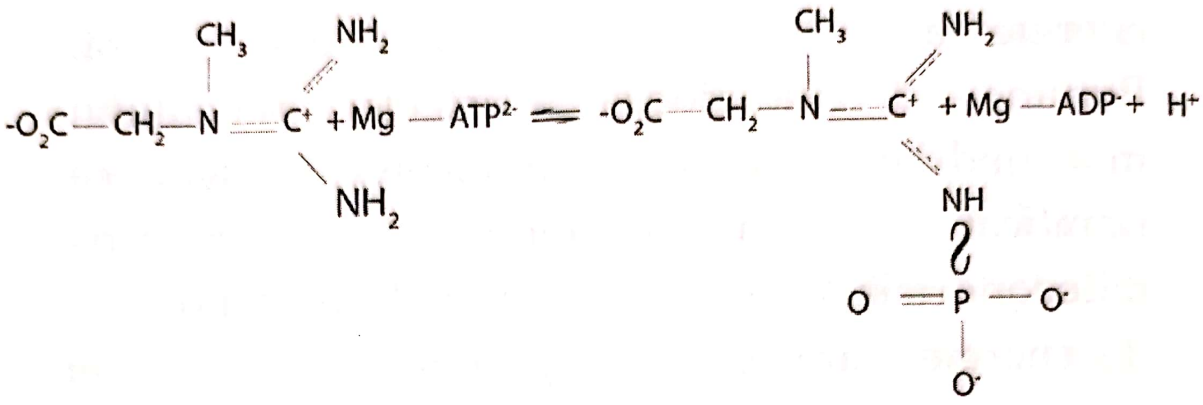
Referitor la mecanismul transportului de energie, a fost emisă o cu totul altă ipoteză. Pornind de la ideea existenței reticulului mitocondrial – a unei mitocondrii gigantice ramificate – s-a considerat că membrana mitocondrială însăși poate servi drept conductor de energie, care este transportată de-a lungul ei prin propagarea potențialului membranar [368]. O astfel de ipoteză este, probabil, nefondată, cel puțin pentru inimă, unde mitocondriile sunt prezente în forma lor *„clasică"*, de organite celulare, izolate, mărginite de o membrană dublă. Acest fapt se observă bine, în special, în experimentele în care membrana superficială a celulelor este distrusă selectiv, fără omogenizarea țesutului, în mediu acalcic și în țesututul perfuzat în prealabil cu calciu. Din celulele cu membrana distrusă are loc o eliminare masivă de mitocondrii intacte, cu obișnuita formă ovală și membranele închise [145].

1.4. REACȚIA CREATINKINAZEI

Fermentul creatinkinazei (adenozin-5′-trifosfat: creatină *N*-fosfotransferază, C_rP 2.7.3.2)

Scanned with OKEN Scanner

catalizează reacţia reversibilă de fosforilare a creatinei, cu folosirea de *Mg-ATP* [420]:



Reacţia, care decurge de la stânga la dreapta (*sinteza fosfocreatinei*), de regulă, se numeşte directă, iar de la dreapta la stânga – reacţie creatinkinazică inversă. Energia liberă standard a hidrolizei fosfocreatinei depăşeşte energia liberă standard a hidrolizei *Mg-ATP* (36 kJ/moli la *pH* de 7,5şi t = 30° C) la 6 – 8 kJ/moli; de aceea, din punct de vedere termodinamic, este mai avantajoasă reacţia inversă [323, 420]. Constanta echilibrată a reacţiei creatinkinazice

$$K_{echil} = \frac{[Mg-ADP]*[PCr]*[H^+]}{[Mg-ATP]*[Cr]},$$

la 30^0, este egală cu $2{,}81 \cdot 10^{-10}$ [420]. Aparenta constantă a echilibrului, mai comodă pentru aplicarea practică, $K^{apar}_{echil} = K_{echil} / [H^+]$, depinde

Scanned with OKEN Scanner

de *pH*-ul amestecului de reacție; la *pH*= 7,4 este egală cu $0,706 \cdot 10^{-2}$. Din această cauză, în amestecul de reacție, se menține întotdeauna un raport ridicat, în comparație cu $[PC_r]/[C_r]$, și anume [*Mg-ATP*]/ [*Mg-ADP*]; în prezența creatinei şi a fosfocreatinei în concentrații egale, acest raport este egal sau mai mare de 100 (*aici şi mai departe*, C_r şi PC_r = *creatina şi, respectiv, fosfocreatina*).

Toate sursele bibliografice, fără excepție, prezintă creatinkinaza ca existând în formă de moleculă dimeră, cu o masă moleculară de 82.000, masa moleculară a subunităților fiind 41.000; acestea din urmă sunt legate între ele necovalent și se pot disocia la o forță ionică ridicată [87, 183]. Ambele subunități ale creatinkinazei sunt active catalitic și conțin, practic, centri activi identici; întrucât pentru dimer nu s-a descoperit prezența vreunei interacțiuni cooperatoare, semnificative funcțional între subunități, rămâne o enigmă, până în prezent, necesitatea existenței fermentului în formă de dimer.

Centrul activ al creatinkinazei conține diferite segmente pentru fixarea substraturilor adenilice și guanidinice, ce se pot lega cu fermentul separat, în lipsa unui al doilea substrat; de aceea, fixarea substraturilor se produce după un mecanism nereglementat (din cauza prezenței unui loc comun de fixare, atât *ATP* şi *ADP*, cât și creatina și

Scanned with OKEN Scanner

fosfocreatina concurează între ele pentru aceste locuri de fixare) [271, 420]. Reacția enzimatică, catalizată de creatinkinază, produce formarea unui complex ferment-substrat ternar, cu transfer direct al fosfatului în starea intermediară a acestui complex [240, 256, 270, 271]. Datele cinetice și rezultatele studierii schimbului de izotopi, efectuat la o temperatură de 25-37°C, arată că stadiul limitativ de viteză este reprezentat de însăși reacția catalitică a transferului grupei fosforilice și, în aceste condiții, mecanismul cinetic al reacției poate fi descris ca un mecanism continuu B_i -B_i (*după W.W. Cleland* [160]), cu o cuplare nereglementată, cvasiechilibrată a substraturilor [270, 271, 272, 467].

Pe de altă parte, cercetările fizico-chimice efectuate cu aplicarea metodelor de crioenzimologice și de rezonanță magnetică nucleară (*RMN*) a compușilor fosforici, au demonstrat că transformarea complexului ternar de ferment-substrat în complex ternar al fermentului cu produși nu limitează viteza de reacție [25, 310]. Totuşi, aceste date au fost obținute doar la o temperatură de 4°C și, de aceea, se prea poate ca, la o scădere semnificativă de temperatură, să se producă o deplasare a stadiului limitativ de viteză, din cauza diferențelor energiilor de activare a diferitelor stadii [310].

Scanned with OKEN Scanner

Prin modificarea grupelor funcționale ale fermentului, s-a stabilit că, la crearea segmentului catalitic, în centrul activ al creatinkinazei, iau parte: amino-gruparea lizinei, gruparea imidazolică a histidinei, gruparea guanidinică a argininei și *SH*-gruparea cisteinei [75, 168, 305, 420]. În molecula dimeră a creatinkinazei, există două grupări *SH* reactive (*o grupare SH la monomer sau la centrul activ*), a căror cuplare cu reagenți-*SH* este, de regulă, însoțită de completa inactivare a fermentului [305, 420]. Formarea complexului ferment-substrat ternar, catalitic activ şi/sau a complexului de tranziție, protejează fermentul de inactivarea de către reagenții care leagă specific grupările funcțional-active ale centrului catalitic al fermentului [420], de inactivarea cu tripsină și anticorpi, împotriva creatinkinazei [355, 420]. Izolate, creatina şi *Mg-ATP* nu exercită o asemenea acțiune [420].

Aceste date, precum și rezultatele studierii structurii centrului activ al creatinkinazei și ale studierii dinamicii de modificare a acesteia la fixarea moleculelor ligand prin metode de rezonanță electronică paramagnetică (*REP*) şi *RMN*, cu utilizare de marcări fluorescente și metode de relaxare, demonstrează că, la formarea, în cursul reacției, a stării de tranziție, în zona centrului activ se produc modificări locale, dar

Scanned with OKEN Scanner

semnificative conformațional [255, 256, 110]. Se consideră că centrul catalitic al creatinkinazei poate avea câteva conformații diferite, echilibrate între ele și că doar substraturile active (*însă nu analogii lor structurali*) sunt capabile să producă, în complexul ternar, o deviere în direcția producerii unei asemenea stări conformaționale, în care grupările funcționale ale centrului sunt capabile să activeze legăturile chimice în moleculele substraturilor [256].

Date extrem de interesante și importante, cu privire la modificările energetice în cursul reacției de creatinkinază, s-au obținut la măsurarea prin metoda concentrației ^{31}R-*RMN* a complexelor $E \cdot Mg\text{-}ATP \cdot C_r$ și $E \cdot Mg\text{-}ADP \cdot PC_r$ în amestec echilibrat, când concentrația fermentului a depășit-o semnificativ pe aceea a substraturilor. Drept urmare, a fost exclusă influența substraturilor și a produșilor în soluție [310].

Măsurătorile au indicat, că pentru substraturile și produșii fixați cu ferment, constanta de echilibru

$$K_{echil} = \frac{[E*Mg-ADP*Cr]}{[E*Mg-ATP*Cr]}$$

este egală cu **1** [309, 318]. Un fapt ce înseamnă că însăși reacția de catalizare nu este însoțită de modificarea energiei libere; aceasta din urmă se

Scanned with OKEN Scanner

produce în stadiile de fixare și disociere a substraturilor și produșilor [197]. Date similare au fost obținute și pentru alte reacții ale kinazei, unde reacția de sumație e însoțită de o modificare semnificativă a energiei libere, de sistem [166, 309], aceeași situație observându-se în cursul reacției actomiozinei *ATP*-azice [198]. Se creează impresia că toate aceste reacții, poate că și multe alte reacții fermentative, de transformare a energiei, în pofida deosebirii mecanismelor moleculare de desfășurare a lor, se supun unor principii comune, conform cărora, modificarea energiei de sistem depinde de modificarea energiei libere în stadiile de formare și disociere a complexelor ferment-substrat [198, 309].

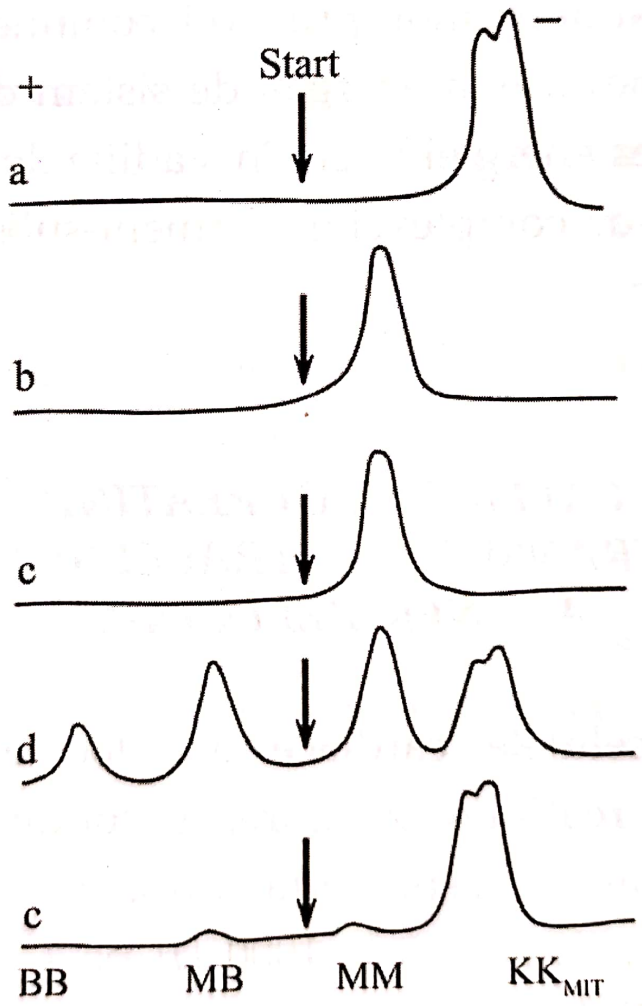
1. 5. CALEA FOSFOCREATINICĂ DE TRANSPORT INTRACELULAR AL ENERGIEI ÎN INIMĂ

În celulele cardiace are loc o activitate majoră a creatinkinazei care, în condiții standard de determinare, reprezintă, după reacția inversă (sinteza *ATP*), în jur de 1000 *UI* pe 1 gr. de țesut umed [333]. În mușchii scheletici, această activitate estește mai intensă. În celulele cardiace ale animalelor cu sânge cald, se găsesc 4 izofermenți ai

Scanned with OKEN Scanner

creatinkinazei, care se deosebesc după mobilitatea electroforetică (*Graficul* 1), precum și după proprietățile imunochimice și componența aminoacizilor [317, 333, 420].

În afară de forma musculară (*MM*), forma cerebrală (*BB*) și forma hibridă (*MB*), o parte însemnată a creatinkinazei este legată de mitocondrii, sub forma izofermentului specific, mitocondrial, al creatinkinazei (C_rK_{mit}) (*Graficul* 1).



Graficul 1. **Electroforegramele creatinkinazei, extrase din diverse structuri celulare separate ale inimii și ale fracției generale de creatinkinază a unei inimi de șobolan [139]**

Scanned with OKEN Scanner

- ***a – mitocondrii***
- ***b – miofibrile***
- ***c – membrana sarcolemei***
- ***d – extract general***
- ***e – nuclei***

Efectuarea electroforezei cantitative, investigarea distribuției creatinkinazei în celule, prin metodele de extracție fracționată și studierea structurilor celulare separate, în mediu de zaharoză, și purificate minuțios, au indicat că în mitocondrii se concentrează circa 30-40% din activitatea generală a creatinkinazei celulei cardiace. În jur de 40-45%, aceste structuri sunt localizate în citoplasmă (izofermenții *BB* şi *MB – complet, iar izofermentul MM – aproximativ jumătate*); 15-20%, sub forma izofermentului *MM*, se leagă de miofibrile, de membrana reticulului sarcoplasmic și de membrana sarcolemală (*superficială*) [358, 359]. Creatinkinaza (*izoferment, identic electroforetic cu cel mitocondrial*) este depistată atât în nucleii celulelor cardiace cât și în nucleii celulelor mușchilor scheletici [107]; rolul creatinkinazei nu este încă în totalitate clar. Distribuția eterogenă a izofermenților creatinkinazei în celulele cardiace este perfect ilustrată de rezultatele studierii electronomicroscopice histochimice a țesutului

Scanned with OKEN Scanner

cardiac intact [366]. Aceste date, demonstrează clar că, în toate structurile celulare în care au loc reacții de producere a energiei (*mitocondriile şi citoplasma*) sau reacții care necesită consum de energie (*miofibrilele și membranele celulare*), se depistează creatinkinaza. O distribuție similară a creatinkinazei este proprie și celulelor mușchilor scheletici, în care, totuși, la nivel citoplasmatic, există doar izofermentul *MM* de înaltă activitate dar lipsesc izofermenții *MB* și *BB* [170].

Distribuția eterogenă a izofermenților creatinkinazei în celule reprezintă baza biochimică de existență a căii fosfocreatinice de transport energetic intracelular [348]. Este extrem de interesant faptul că toți acești diverși izofermenți sunt cinetic identici [334], ceea ce exclude posibilitatea exercitării a diverselor lor roluri funcționale, în celule, pe baza diferențelor de proprietăți cinetice. Afinitatea tuturor izofermenților la substraturile reacției inverse *Mg-ADP* și la fosfocreatină este cu aproape un ordin mai ridicată decât afinitatea lor la substraturile reacției directe *Mg-ADP* și la creatină, iar viteza maximă a reacției inverse depășește de 4 ori această valoare pentru reacția directă a ceatinkinazei [164, 334, 335]. Asemenea proprietăți cinetice corespund termodinamicii reacției creatinkinazei, a cărei constantă de echilibru

Scanned with OKEN Scanner

(*aparentă*, vezi *supra*) este egală cu $0,7 \cdot 10^2$ în sensul direct de formare a fosfocreatinei şi este legată de constantele cinetice prin corelaţia Haldane Y.B.S. [76].

Numeroasele studii efectuate până în prezent au evidenţiat determinarea comportamentului funcţional a izofermenţilor creatinkinazei în celule, prin locul de stabilire şi prin caracterul reacţiilor ce se desfăşoară în imediata lor microambianţă [337]. Compararea comportamentului creatinkinazelor în diferite structuri ale celulei cardiace permite o perfectă ilustrare a valorii sistemelor multi- şi poli-fermentative pentru reglarea atât a activităţii diferiţilor fermenţi, cât şi a unor întregi sisteme metabolice ale celulei.

1.5.1. Reacţia citoplasmatică a creatinkinazei

În citoplasmă sau, cel puţin, într-o fracţiune citoplasmatică, obţinută din inimă, creatinkinaza există în stare solubilă şi, de aceea, comportamentul ei caracterizează comportamentul fermentului în sistemul omogen, unde interacţiunea dintre fermenţi se produce prin produşii intermediari ai reacţiilor din mediu.

Fracţiunea citoplasmatică sau citozolică din inimă, conţinând toţi fermenţii glicolitici şi

Scanned with OKEN Scanner

creatinkinaza, în proporţii apropiate de cele *in vivo*, catalizează formarea lactatului şi, conjugată cu acesta, sinteza firească a fosfocreatinei, în prezenţa concomitentă a creatinei şi glucozei, a fructozei-*1,6*-difosfat sau a fosfoenolpiruvatului, în calitate de substraturi glicolitice [205]. Raportul stoichiometric al fosfocreatinei cu lactatul a fost, în toate cazurile, apropiat de mărimea, teoretic, maximă, la o concentraţie constantă a *ATP*-ului în sistem [205]. La o concentraţie suficient de ridicată a creatinei, raportul maselor reactante ale reacţiei creatinkinazice a rămas tot timpul constant şi a fost egal cu aparenta constantă de echilibru a reacţiei, ceea ce înseamnă că reacţia creatinkinazică nu limitează viteza generală a sintezei fosfocreatinei, ci, dimpotrivă, se află în stare de echilibru [138].

Viteza maximă a reacţiei directe creatinkinazice în sistem, efectuată în experimente separate, a fost semnificativ mai ridicată decât viteza observată a sintezei conjugate a fosfocreatinei, cu formare de lactat şi, în ultimul proces, s-a folosit nu mai mult de 20% din potenţialul catalitic al creatinkinazei. Utilizarea ecuaţiilor cinetice care descriu comportamentul creatinkinazei şi al fermenţilor glicolitici, în special al piruvatkinazei în sistemul omogen, a permis ilustrarea, din punct de vedere cantitativ, a sintezei fosfocreatinei în acest sistem [205]. Într-un

Scanned with OKEN Scanner

asemenea sistem, sinteza fosfocreatinei este condiționată de deplasarea constantă a stării de echilibru a reacției creatinkinazice prin reducerea concentrației *Mg-ADP* prin reacțiile glicolitice de fosforilare a ultimului; concentrația fosfocreatinei este determinată prin următoarea expresie:

$$(PC_r)_t = K^{apar}_{echil} * ([ATP]_0/[ADP_t]) * [C_r],$$

unde: $[PC_r]_t$ şi $[ADP]_t$ – sunt concentrațiile de fosfocreatină şi *Mg-ADP* la timpul respectiv; $[ATP]_0$ – concentrația [*Mg-ATP*], care este, practic, o mărime constantă.

Una dintre urmările semnificative ale acestei stări de echilibru a creatinkinazei în sistemul omogen este, totuși, sensibilitatea foarte ridicată a reacțiilor conjugate la inhibarea de către produs, fosfocreatina: la o concentrație a ultimei de 10-15 *mM*, viteza sintezei fosfocreatinei, conjugate cu glicoliză, se reduce cu 90% [205].

În prezența fosfocreatinei în mediu, cu o concentrație ridicată (*în celule, concentrația ridicată de fosfocreatină este asigurată de sinteza acesteia în mitocondrii, vezi în continuare*), starea de echilibru a reacției creatinkinazice se deplasează în direcția reducerii de concentrație *ADP* până la o valoare extrem de joasă, ceea ce duce la scăderea vitezei reacțiilor glicolitice, dependente de *ADP*. Calculele

Scanned with OKEN Scanner

demonstrează că într-o inimă aerobă, la concentrații fiziologice de fosfocreatină, creatină și *ATP* total, concentrația globală a *ADP*-ului liber nu depășește 50 *mcrM* [337], dacă reacția citoplasmatică de creatinkinază se află în echilibru; această mărime coincide cu rezultatele determinării indirecte a *ADP*-ului [398] și este mai mică decât mărimea K_m pentru *ADP*-ul în reacțiile glicolitice-cheie (aproximativ 0,2*mM*).

În felul acesta, reacția citoplasmatică de creatinkinază, în celulele cardiace aerobe, participă, cel mai probabil, la reglarea și inhibarea glicolizei prin sistemele de producere mitocondrială aerobă a energiei, pe seama oxidării acizilor grași.

La scăderea concentrației de fosfocreatină în condiții anoxice sau ischemice în cazul deplasării reacției de creatinkinază (*a stării ei de echilibru*), se mărește concentrația de *ADP*, ceea ce favorizează activarea glicolizei; prin starea de echilibru a reacției de adenilatkinază, creșterea concentrației de *ADP* provoacă mărirea conținutului celular de *AMP*, activatorul fosfofructokinazei. Conform datelor obținute, activarea glicolizei trebuie să stimuleze sinteza de fosfocreatină în citoplasmă.

Un asemenea comportament al creatinkinazei solubile permite, de asemenea, explicarea, într-o anumită măsură, a particularităților energeticii mușchilor scheletici albi rapizi, în celulele cărora

Scanned with OKEN Scanner

producerea de energie se bazează, în principal, pe glicoliză şi pe producerea de lactat şi *ATP*, precum pe sinteza de fosfocreatină în citoplasmă. Întrucât, un astfel de sistem omogen, conjugat, nu asigură regenerarea rapidă a fosfocreatinei, în prezența acesteia, creşterea consumului de energie la contracțiile rapide trebuie să ducă inevitabil la reducerea accelerată a conținutului de fosfocreatină, a cărei resinteză poate avea loc cu o viteză semnificativă doar la un conținut scăzut în celule; pentru refacerea completă a fosfocreatinei este necesară o perioadă mai mare de timp şi activarea producerii sale în mitocondrii.

1.5.2. Sinteza fosfocreatinei mitocondriale

Deoarece baza funcționării celulelor cardiace o reprezintă sinteza aerobă de *ATP* în mitocondrii, pentru elucidarea rolului sistemelor creatinkinazice în inimă, cea mai mare importanță o are descrierea mecanismului de funcționare a creatinkinazei în mitocondrii, unde ea este prezentă sub forma unui izoferment separat, care se deosebește de alți izofermenți, atât electroforetic, cât şi imunochimic [138, 162, 317].

Izofermentul mitocondrial al creatinkinazei a fost descris pentru prima dată în anul 1964, în

Scanned with OKEN Scanner

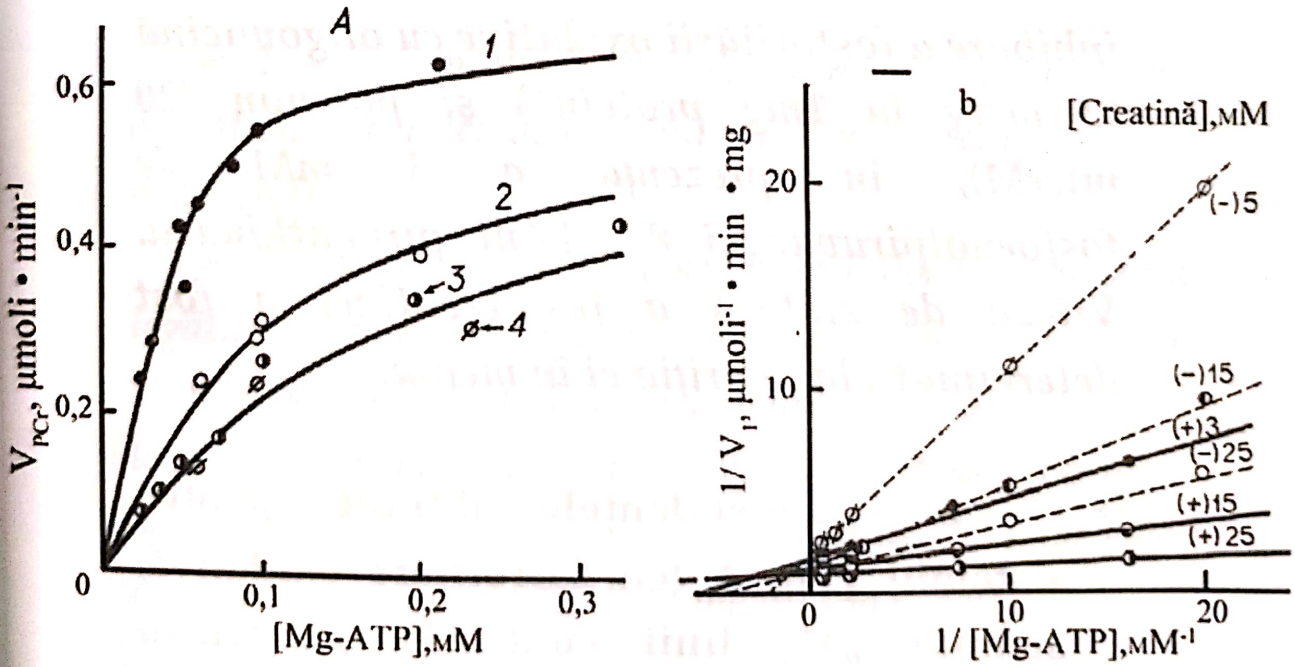
laboratorul lui M. Klingenberg [162]. S-a stabilit cu precizie că de fapt creatinkinaza mitocondrială este legată de suprafața interioară a membranei interne a mitocondriilor [164, 359]. Întrucât, pentru extragerea creatinkinazei din mitocondrii este necesară tratarea preparatului mitocondriilor cu soluții saline (0,1 *mM* fosfat de sodiu), legătura fermentului cu membrana se realizează, în principal, prin interacțiunile ionice (*ca şi în cazul citocromului c* [139, 153, 410].

Totuşi, ulterior, s-a făcut cunoscut faptul că, la realizarea legăturii creatinkinazei cu membrana mitocondrială, participă şi grupările *SH* ale proteinei (*sau proteinelor*) [185].

Datorită localizării pe partea exterioară a membranei interne, creatinkinaza mitocondrială poate interacționa cu substraturile din mediu; totodată, aceasta poate utiliza *ATP*-ul sintetizat în matricea mitocondrială, ca urmare a fosforilării oxidative, după transportul celui din urmă de către translocaza *ATP-ADP*, prin membrana mitocondrială [164, 337, 346]. Concomitent cu sinteza fosfocreatinei, din *ATP* se formează *ADP*, ceea ce menține fosforilarea oxidativă şi, ca urmare a acestui fapt, reacția de creatinkinază poate realiza controlul acceptor al respirației şi poate efectua un control absolut al vitezei de absorbție a oxigenului de către mitocondrii [33, 164, 337].

Scanned with OKEN Scanner

Fosforilarea oxidativă accelerează semnificativ sinteza fosfocreatinei, după cum s-a arătat în *Graficul 2*. În acest grafic, se poate observa dependența vitezei de sinteză a fosfocreatinei *Vpcr* de concentrația *Mg-ATP* în mediu, la 25 *mM* creatină, în variate condiții de funcționare a fermentului. În primul sistem (curba *1*, în *Graficul 2*), au fost prezente mitocondrii intacte, izolate din inimă, mitocondrii ce conțin creatinkinază, legată de membrana internă mitocondrială şi a cărei funcționare a fost inițiată prin adaos de *Mg-ATP*; în continuare, reacția a decurs în condiții de fosforilare oxidativă. În sistemele *2*, *3* şi *4*, creatinkinaza mitocondrială a interacționat cu sistemele generative de *ATP*, prin *ATP* şi *ADP* în mediu.



***Graficul 2.* Dependența vitezei de sinteză a fosfocreatinei în reacția creatinkinazică mitocondrială de concentrația *Mg-ATP* în mediu**

Scanned with OKEN Scanner

✧ *A* – **mediul a conținut 25 *mM* creatină, *pH* = 7,4, temperatura = 30° C**

- *1 – mitocondrii intacte din inimă de șobolan; reacția de creatinkinază s-a produs în condiții de fosforilare oxidativă, în prezența a 5 mM fosfat, 5 mM glutamat și 2 mM malat de potasiu;*
- *2 – creatinkinaza, extrasă din mitocondriile inimii de șobolan, cu mitocondrii din ficat (lipsite de creatinkinază), în condiții de fosforilare oxidativă;*
- *3 – creatinkinaza extrasă din mitocondriile inimii, în prezența a 3 mM fosfoenolpiruvat și 8 mE/ml piruvatkinază;*
- *4 – mitocondrii cardiace intacte, în condiții de inhibare a fosforilării oxidative cu oligomicină (2 mcrg la 1mg proteină) și potenon (20 micrM), în prezența a 3 mM de fosfoenolpiruvat și 8 mE/ml piruvatkinază. Viteza de sinteză a fosfocreatinei a fost determinată la apariția ei în mediu.*

✧ *B* – **dependențele obținute pentru sistemul *1* la A (cu fosforilare oxidativă, semnul „+", linii continui) și pentru sistemul *4* (fără fosforilare oxidativă, semnul „–", linii intermitente), la diverse**

Scanned with OKEN Scanner

concentrații constante de creatină în mediu, prezentate în coordonate inverse duble [163].

Experimentele de control au demonstrat că extracția fermentului din mitocondrii nu este însoțită de modificarea proprietăților lui cinetice [341]. După cum se observă din *Graficul 2*, doar în mitocondriile cardiace native, în care reacția de creatinkinază este conjugată cu fosforilarea oxidativă din aceleași mitocondrii, viteza de sinteză a fosfocreatinei crește brusc, la mărirea concentrației de *Mg-ATP* până la 0,1*mM* (curba *1*). Aceste rezultate impun două concluzii deosebit de importante:

- **1** – *în condiții identice, în mediu, fosforilarea oxidativă accelerează sinteza fosfocreatinei în mitocondrii;*
- **2** – *această accelerare se observă doar în prezența legăturii fermentului cu membrana mitocondriilor, ce sintetizează ATP-ul şi, prin urmare, depinde de sediul localizării fermentului;este necesar să reținem că toate sistemele ATP-regenerative au menținut, în mod egal, concentrația joasă de ADP în mediu* [341, 349].

Întrucât, după cum rezultă din *Graficul 2*, fosforilarea oxidativă influențează semnificativ

Scanned with OKEN Scanner

dependența vitezei de sinteză a fosfocreatinei de concentrația în mediu a *ATP*-ului, un mare interes prezintă problema acelor proprietăți ale reacției de creatinkinază ce se modifică în condițiile fosforilării oxidative. Rezultatele analizei cinetice complete, efectuate pentru creatinkinaza cardiacă, legată de membrana mitocondrială, în prezența și în absența fosforilării oxidative (*în ultimul caz este* sistemul 4,din *Graficul* 2.***A***), sunt indicate în *Graficul* 2.***B***. În ambele condiții, în coordonatele inverse duble, se obține un grup de linii drepte, care, totuși, se deosebesc între ele și, în condiții de fosforilare oxidativă, vitezele de reacție sunt întotdeauna mai ridicate, la orice concentrații ale substraturilor ($1/v$ mai scăzută).

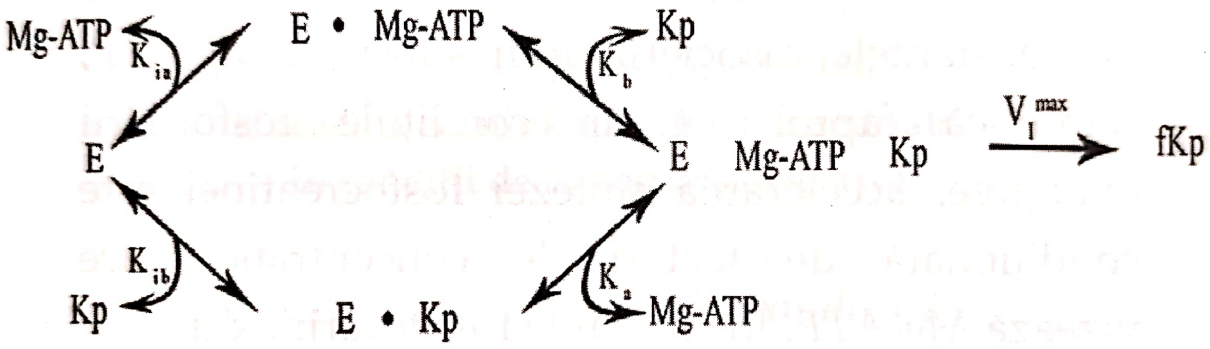
Analiza unghiurilor ordonatelor drepte și secționate pe axă ale segmentelor permite evaluarea valorilor tuturor parametrilor reacției de creatinkinază [271]; mărimile obținute sunt înfățișate în *Tabelul* următor:

	FĂRĂ FOSFORILARE OXIDATIVĂ	***ÎN CONDIȚII DE FOSFORILARE OXIDATIVĂ***
K_{ia} *(Mg-ATP), mM*	0, 75±0, 06	0, 29 ±0, 04
K_a *(Mg-ATP), mM*	0, 15±0, 001	0, 014±0, 005
Kib (C_r), *mM*	28, 8±8, 4	29, 4±4, 2

Scanned with OKEN Scanner

Kb (C_r), Mm	5, 2±0, 2	5, 2±2, 3
V_t^{max}, mcrmoli într-un min, pe 1mg de mitocondrii	1, 06±0, 2	0, 99±0, 1

Constantele prezentate sunt constante de disociere a substraturilor indicate în paranteze, din complexele ferment-substrat; formarea și disocierea se produc după schema următoare [271]:



Datele prezentate [271] demonstrează faptul că fosforilarea oxidativă nu influențează:

- ✓ **1** – *viteza maximă a reacției şi, în consecință, numărul moleculelor active ale fermentului, iar potențialul lui catalitic nu se modifică sub influența fosforilării oxidative*

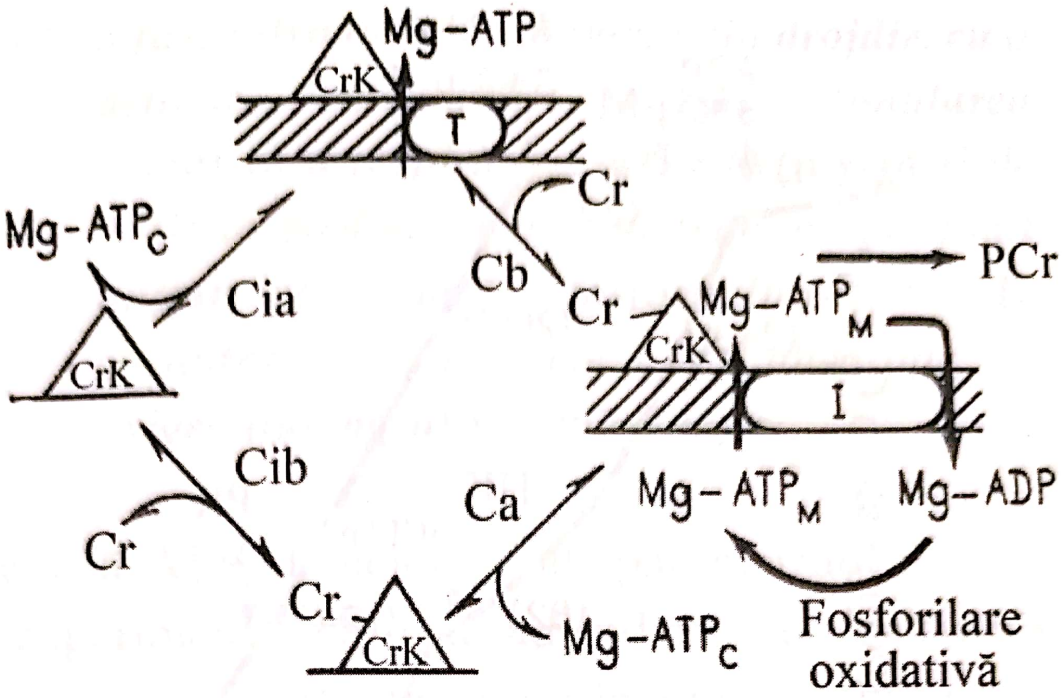
- ✓ **2** – *constantele disocierii (sau ale fixării) creatinei; în felul acesta, modificările nu*

Scanned with OKEN Scanner

influențează segmentul de fixare a substraturilor guanidinice în situs*-ul activ al fermentului*

În același timp, se observă modificări semnificative în constantele disocierii *Mg-ATP*. Constanta disocierii *Mg-ATP* de complexul ternar ferment-substrat $E \cdot Mg\text{-}ATP \cdot C_r$, K_a se reduce considerabil, cu o ordine de mărime. Într-o mai mică măsură, de 2,5-3 ori, se reduce constanta disocierii *Mg-ATP* de complexul binar ferment-substrat $E \cdot Mg\text{-}ATP$, K_{ia}. Modificările,ținând doar de constantele disocierii unui substrat, *Mg-ATP*, semnifică faptul, că, în condițiile fosforilării oxidative, accelerarea sintezei fosfocreatinei este condiționată de factori de concentrație, care vizează *Mg-ATP*. În condițiile fosforilării oxidative, constantele, măsurate după concentrațiile de *Mg-ATP* în mediu, sunt aparente și efectele supervizate se explică perfect prin supoziția utilizării cu precădere a *ATP*-ului mitocondrial, pe calea transmiterii moleculelor de *ATP* de către translocaza *ATP-ADP* direct pe *situs*-ul activ al creatinkinazei, aflată pe partea exterioară a membranei interne mitocondriale [262].

Scanned with OKEN Scanner

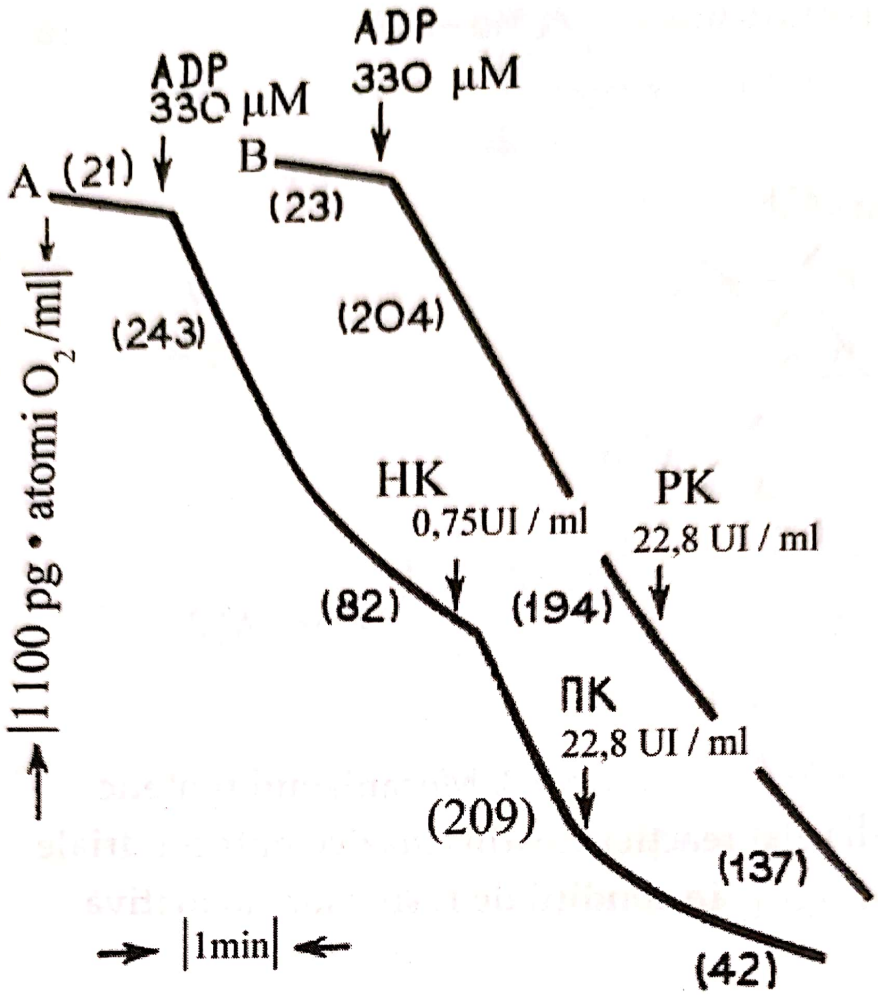


Graficul 3. **Mecanismul ipotetic al reacției creatinkinazice mitocondriale, în condiții de fosforilare oxidativă**

- ***C_rK – creatinkinaza mitocondrială***
- ***T – adeninnucleotid translocază***
- ***Mg-ATP_C – MG-ATP _ în mediu;***
  Mg-ATP_m – ATP _ sintetizat în mitocondrii
- ***C_r – creatinină***
- ***PC_r – fosfocreatină***

- *Este vizibilă legătura dintre complexele binare şi ternare ferment-substrat şi influența fosforilării oxidative şi a transportului de ATP prin translocază asupra formării lor.*

Scanned with OKEN Scanner



Graficul 4. **Importanța localizării reacției generative de *ADP* pentru reglarea fosforilării oxidative mitocondriale**

❋ *Mediul polarografic standard [341] a conținut mitocondrii cardiace de şobolan (0,46 mg/ml) şi în sistem de glucoză A 10 mM, în sistem de creatină B 33 mM (pentru stimularea reacției de creatinkinază: în acest caz, după consumarea de ADP, viteza de absorbție a oxigenului aproape că nu se modifică, datorită sintezei ADP-ului în reacția de creatinkinază pe membrană). În momentul indicat de săgeată, în sistemul A*

Scanned with OKEN Scanner

a fost introdusă hexokinază din drojdie, cu o acțiune suficientă pentru stimularea completă a respirației, datorită generării de ADP în mediu. Ambele sisteme au conținut inițial 2,5 mM fosfoenolpiruvat. În paranteze – vitezele de absorbție a oxigenului, ng·atom·min^{-1}·mgr^{-1}.

Analiza dependențelor *pH* ale parametrilor reacției și experimentele directe au indicat că accelerarea vitezei de sinteză a fosfocreatinei nu este legată de energizarea membranei sau de modificarea *pH*-ului lângă membrană, ca urmare a fosforilării oxidative [337]. Schema ipotetică a unei conjugări funcționale atât de directe a translocazei cu fosfocreatinkinaza şi, în felul acesta, şi mecanismul de sinteză a fosfocreatinei în condiții de fosforilare oxidativă sunt înfățişate în *Graficul3*. Această schemă se bazează pe supoziția conform căreia creatinkinaza și translocaza nu se află întâmplător în apropiere nemijlocită una de alta. Complexul binar *E·Mg-ATP*, format din *ATP*-ul mitocondrial, poate să se disocieze, în mare măsură, până la fixarea creatinei și să se echilibreze, măcar și parțial, cu *Mg-ATP* în mediu, fapt ce explică modificarea mai redusă a K_{ia}, decât a K_a.

În acest mod, datele cinetice arată că prin folosirea *ATP*-ului mitocondrial crește în primul

Scanned with OKEN Scanner

rând concentrația staționară a complexului ternar, central, activ catalitic în reacția de creatinkinază *E ·Mg-ATP· C_r*,ceea ce duce la accelerarea sintezei fosfocreatinei. Întrucât *Mg-ATP* și fosfocreatina nu se pot asocia, în același timp, cu creatinkinaza, din cauza închiderii grupărilor fosfatice terminale [270], o astfel de îmbinare directă are o consecință importantă, în afară de accelerarea sintezei de fosfocreatină – scade, într-un grad semnificativ, inhibarea activității creatinkinazei de către produsul ei, fosfocreatina [387], ceea ce este important pentru funcționarea fermentului în celulele intacte, care conțin fosfocreatină în concentrație ridicată. S-a demonstrat experimental că, în condițiile fosforilării oxidative, sinteza fosfocreatinei se inhibă în mitocondrii, într-un grad sensibil mai mic decât procesul conjugat cu glicoliza, la concentrații similare de fosfocreatină [337, 341].

Ipoteza conjugării funcționale directe a translocazei și creatinkinazei în mitocondriile cardiace este confirmată, de asemenea, de următoarele date experimentale:

- **1** – *prin metoda titrării grupărilor SH ale creatinkinazei, s-a demonstrat că în mitocondriile cardiace creatinkinaza şi translocaza sunt prezente*

Scanned with OKEN Scanner

în raport stoichiometric 1:1 (aproximativ, 1 nmol la 1 mg de proteină).

- **2** – *prin folosirea adaosului de [γ-^{32}P] – ATP în mediu, s-a văzut că, în prezența unui fosfat anorganic nemarcat, sinteza mitocondrială a fosfocreatinei se realizează în special din ATP-ul nemarcat, sintetizat în mitocondrii [439]*

- **3** – *în condițiile fosforilării oxidative, raportul maselor reactante ale reacției de creatinkinază diferă de constanta de echilibru și este deplasat în direcția formării fosfocreatinei, ceea ce arată caracterul dezechilibrat al reacției de creatinkinază, ca urmare a controlului asupra ei din partea translocazei [89]*

Conjugarea funcțională directă, descrisă anterior, a proteinei transportoare de translocază, cu fermentul utilizator de substrat *ATP*, tolerat de creatinkinază, asigură practic folosirea completă a *ATP*-ului mitocondrial pentru sinteza fosfocreatinei (raportul $[PC_r]/[O_2]$ este egal cu 2,5-2,8 [337, 341]). Decurge de aici că, în condiții fiziologice, la prezența creatinei în celule, produsul final macroergic al reacțiilor mitocondriale generatoare de energie este fosfocreatina, care

Scanned with OKEN Scanner

trebuie privită acum ca fiind cel mai probabil concurent la rolul de transportor al energiei.

Totuşi, rolul reacţiei de creatinkinază mitocondrială nu se reduce la aceasta. Reacţia respectivă participă în mod direct la controlul fosforilării oxidative mitocondriale, deoarece *ADP*-ul format simultan cu fosfocreatina, probabil, fără eliberare în mediu, se îndreaptă dinspre creatinkinază spre translocază şi apoi spre matricea mitocondriilor, după cum se poate prevedea pe baza schemei din *Graficul 3*. Această cale a *ADP*-ului este suficient de clar conturată de datele prezentate în *Graficul 4*. Sunt indicate rezultatele înregistrării respiraţiei mitocondriale la două modalităţi diferite de generare a *ADP*-ului.

În primul caz (curba *1*), în mediu s-au adăugat glucoză şi hexokinază (*HK*), care a folosit *ATP*-ul sintetizat în mitocondriile cardiace şi a generat constant *ADP*-ul în mediul ambiant al mitocondriilor.

În cazul al doilea (curba 2), în mediu a fost prezentă numai creatina, iar *ADP*-ul a fost generat în reacţia de creatinkinază pe membrana mitocondrială. În ambele sisteme s-au adăugat fosfoenolpiruvat şi piruvatkinază (*PK*), cu activitate foarte ridicată, pentru îndepărtarea rapidă a *ADP*-ului din mediu. În primul sistem, cu hexokinază, piruvatkinaza a inhibat complet

Scanned with OKEN Scanner

absorbția oxigenului de către mitocondrii, din cauza îndepărtării complete a *ADP*-ului din mediu (***A***). Însă în sistemul al doilea, când *ADP*-ul a fost generat pe membrană în reacția de creatinkinază, piruvatkinaza a inhibat respirația mitocondrială în mai mult de 30-40% (***B***) şi, prin urmare, în cazul acesta, *ADP*-ul a fost, în mare, inaccesibil pentru piruvatkinază şi s-a îndreptat, dinspre creatinkinază prin translocază, înapoi în matrice.

Confirmarea acestor date a venit şi de la laboratorul W. E. Jacobus *et al.*, unde s-a demonstrat că la generarea de *ADP*, în reacția de creatinkinază, ținând de membrana mitocondriilor, scade semnificativ inhibarea translocazei cu atractilozida, un inhibitor concurent al *ADP*-ului [268]. Aceste rezultate ne permit să considerăm că, în celulele cardiace, precum şi în alte celule musculare, viteza de fosforilare oxidativă nu este reglată de către potențialul fosfatic citoplasmatic sau de către *ADP*-ul citoplasmatic, ci de către *ADP*-ul generat în reacția mitocondrială de creatinkinază şi, astfel, ultima reacție ocupă probabil poziția cheie în reglarea respirației mitocondriale.

Din aceste date, se poate trage concluzia că existența interacțiunii nemijlocite a translocazei cu creatinkinaza, în componența complexului multiferment din mitocondriile inimii, determină

Scanned with OKEN Scanner

modul de manifestare, atât al transportului intracelular de energie, cât şi al mecanismului de reglare a fosforilării oxidative.

1.5.3. Reacţiile de creatinkinază în miofibrile pe membrana reticulului sarcoplasmatic şi pe membrana sarcolemală

Cert este că existența căii fosfocreatinice de transport al energiei presupune utilizarea eficientă a fosfocreatinei pentru regenerarea de *ATP*, accesibilă reacţiilor de *ATP*-ază, ce asigură contracția muşchilor. Existența unor astfel de sisteme de folosire eficientă a fosfocreatinei a fost descoperită încă din primele etape de studiere a energeticii contracției musculare (vezi, ***capitolul III***). Prezența activității ridicate a creatinkinazei în citoplasma celulară, în principiu este suficientă pentru asigurarea refosforilării rapide a *ADP*-ului, întrucât reacția de creatinkinază inversă este preferabilă din punct de vedere cinetic și termodinamic [420]. Există, totuşi, multiple date ce indică interacțiunea structurală și funcțională directă a creatinkinazei cu *ATP*-azele din aceste structuri.

S-a observat că miofibrilele purificate ale inimii și ale mușchilor scheletici conțin

Scanned with OKEN Scanner

izofermentul *MM* al creatinkinazei (vezi, de asemenea, *Graficul* 1) care se extrage complet doar la disocierea miofibrilelor în soluții concentrate de *KCl* [290, 334]. Pentru mușchii scheletici s-a văzut că o parte a creatinkinazei miofibrilelor este legată de linia *M* şi creatinkinaza este, probabil, un element integral al acestei structuri [252, 255, 393, 414, 415]. Totuşi, dispunerea exactă a creatinkinazei în miofibrile şi corelația structurală a acesteia cu miozina nu pot fi considerate ca definitiv elucidate.

Din experimentele cu miozină purificată se ştie că aceasta este aptă să formeze complexe cu creatinkinaza; în plus, creatinkinaza se conexează, îndeosebi, cu segmentul anterior al miozinei (subfragmentul *S*-1), dar partea rămasă a moleculei de miozină participă şi ea într-un anume fel la consolidarea complexului [46, 134, 436, 437]. La fixarea creatinkinazei se reduce activitatea *ATP*-azică a miozinei (*activitate, dinamizată de calciu*), dar, în același timp, se observă o scădere semnificativă a K_m pentru adeninnucleotide: în sistemul bienzimatic, K_m pentru *ADP*estevizibil mai redusă decât $K_m$pentru *ATP* în reacția miozinică *ATP*-azică [46, 437]. Această reducere a K_m este interpretată ca dovadă a creşterii concentrației de *ATP*, lângă *situs*-ul activ al miozinei, când *ATP*-ul este sintetizat de

Scanned with OKEN Scanner

creatinkinază în sistemul bienzimatic [45, 436]. O asemenea explicație concordă cu datele obținute în studiul contracției miofibrilelor izolate sau a fibrelor musculare ale inimii lipsite de membrana superficială: un grad similar de contracție se obține la concentrații semnificativ mai mici de *ADP*, în prezența fosfocreatinei, decât concentrațiile de *ATP*, necesare pentru aceasta [301] şi se creează impresia că, pentru miofibrilele native, *ATP*-ul regenerat din *ADP* în reacția creatinkinazică miofibrilară reprezintă un substrat mai eficient decât ATP-ul în mediu sau în mioplasmă. Folosind [γ-^{32}P]-*ATP*, S. P. Bessman şi colaboratorii au arătat că, în amestecul de reacție conținând fosfocreatină nemarcată, miofibrilele cardiace native catalizează eliberarea fosfatului, preponderent din fosfocreatina nemarcată [35], fapt care concordă în mod absolut cu datele prezentate mai sus şi demonstrează capacitatea creatinkinazei de a refosforila *ADP*-ul după formarea lui în reacția de *ATP*-ază, fără eliberare în mediu şi areo mare eficiență în sintetizarea *ATP*-ului necesar contracției. Cu toate acestea, mecanismul molecular de interacțiune a creatinkinazei cu centrul activ al miozinei în miofibrile, necesită a fi elucidat în cercetări viitoare, în special, cu privire la potențialul sistemelor creatinkinazice de a controla forța de contracție a miocardului [348].

Scanned with OKEN Scanner

De membrana reticulului sarcoplasmic, atât al muşchiului inimii, cât şi al celui scheletic, este, de asemenea, legat structural izofermentul *MM* al creatinkinazei [163, 223]. Atât prin metode histochimice pe țesut muscular intact [184, 185], cât și pe preparate izolate ale reticulului sarcoplasmic, s-a demonstrat conjugarea creatinkinazei cu sistemul energo-dependent al transportului activ de calciu(*prin pompă de calciu*) [223]. În aceste experimente s-a lămurit faptul conform căruia creatinkinaza reticulului reprezintă un sistem eficient de transfosforilare, ce menține concentrația direct accesibilă pompei de calciu a *ATP*-ului la nivelul necesar absorbției rapide de calciu [185].

Structura cea mai importantă pentru procesele de conjugare electromecanică, ce controlează contracția (*controlează concentrația intracelulară de calciu*) în inimă, este membrana sarcolemală [210-212]. Pe lângă pompa activă de sodiu-potasiu ce menține, pe seama energiei *ATP*-ului, gradientele transmembranare Na^+şi K^+ necesare pentru efectuarea excitației prin sarcolema celulelor cardiace (*spre deosebire de celulele muşchiului scheletic*), se realizează deplasarea calciului din mediul extracelular în interiorul celulei, în timpul fazei de ***platou*** a potențialului de acțiune şi eliminarea unei părți de calciu din celule, în timpul fazei de relaxare [108, 267].

Scanned with OKEN Scanner

Pătrunderea calciului în celule se produce prin așa-numitele canale calcice lente, potențial-dependente, sub forma unui flux calcic electrogen și prin intermediul schimbului $Na^+ - Ca^{2+}$, deja bine definit [100, 313]. Eliminarea calciului prin sarcolemă se produce pe calea circulației schimbului calciu-sodiu și prin *ATP*-aza *Ca*-dependentă a sarcolemei [69]. Exodul calciului se realizează împotriva gradientului de concentrație și, de aceea, este energo-dependent; totodată, energo-dependentă este și pătrunderea calciului prin canalele lente, probabil din cauza necesității de fosforilare a vreunei proteine a canalului, în reacția de proteinkinază, consumatoare de *ATP*, pentru crearea unui canal activ, apt să reacționeze la depolarizarea membranei [372, 283].

În legătură cu energo-dependența acestor stadii importante ale conjugării electromecanice, un interes deosebit îl reprezintă studierea funcției creatinkinazei, legate de sarcolemă, ca verigă probabilă între fluxurile ionice transmembranare și sistemele energetice intracelulare. Până la ora actuală, s-a stabilit experimental conjugarea funcțională dintre creatinkinază și Na^+, K^+-*ATP*-aza sarcolemei [345]. Totodată, s-a constatat că transportul activ de sodiu și potasiu prin sarcolemă este menținut mult mai eficient atunci când *ATP*-ul se regenerează pe loc, în reacția

Scanned with OKEN Scanner

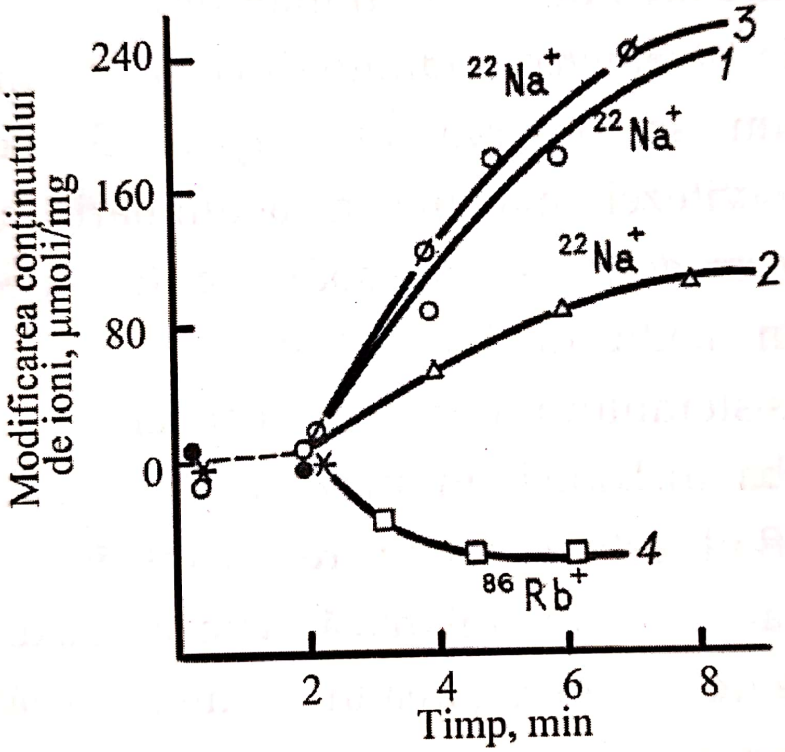
creatinkinazică membranară, pe seama fosfocreatinei, decât la folosirea *ATP*-ului din mediul ambiant [134].

Această situație este demonstrată, în special, prin rezultatele prezentate în *Graficul* 5.

În experimente au fost folosite preparate de membrană sarcolemală izolate din inimă, constând în vezicule închise, orientarea membranei acestora fiind cu interiorul spre „*exterior*". În veziculele date, acumularea de sodiu în interior este similară cu excreția (*eliminarea*) sodiului din celulele intacte. După cum se observă în *Graficul* 5, pentru atingerea vitezei maxime a acumulării active (*împotriva gradientului*) de sodiu, a fost necesar adaosul în mediu de *Mg-ATP* până la 20 *mM*, în prezența sistemului puternic de regenerare a *ATP*-ului (curba *3*).Totuşi, în prezența fosfocreatinei, când *ATP*-ul este constant regenerat în reacția membranară de creatinkinază, viteza maximă a fost atinsă deja la adăugarea în mediu a 0,3*mMMg-ATP* (curba *1*). Dacă judecăm după concentrațiile de *Mg-ATP*, necesare pentru realizarea transportului maxim, alimentarea pompei ionice cu energie prin creatinkinaza membranară este aproximativ de 70 de ori mai eficientă decât aprovizionarea de la *Mg-ATP* din mediu. Acest efect arată, cel mai probabil, dispunerea într-un spațiu apropiat a centrilor activi ai *Na, K-ATP*-azei

Scanned with OKEN Scanner

şi creatinkinazei şi capacitatea ultimei de a refosforila rapid *ADP*-ul în *ATP*, după cât se pare direct lângă centrii activi ai *ATP*-azei, şi de a menţine acolo constant un raport ridicat de *ATP/ADP*, necesar pentru transportul ionic activ. Acesta are nevoie ca energia sistemului *ATP*, adică mărimea potenţialului fosfatic (*a energiei hidrolizei ATP*) în prezenţa *ATP*-azei să depăşească energia liberă a gradientului ionic [134].



Graficul 5. **Dependenţa eficienţei transferului ionilor de sodiu şi potasiu prin membrana sarcolemală a inimii de la sursa de energie**

❋ *În experimente s-a folosit un preparat izolat din inimă de cobai, având orientarea membranei cu interiorul spre „exterior" în*

Scanned with OKEN Scanner

raport cu celulele intacte. În prezența a 30 mM de sodiu şi potasiu şi de izotopi ^{22}Na şi ^{86}Rb, echilibrul izotopic în interiorul şi exteriorul veziculelor a fost atins prin incubare la 0°, în decurs de 30 min; conținutul de echilibru al ionilor este admis ca fiind 0.

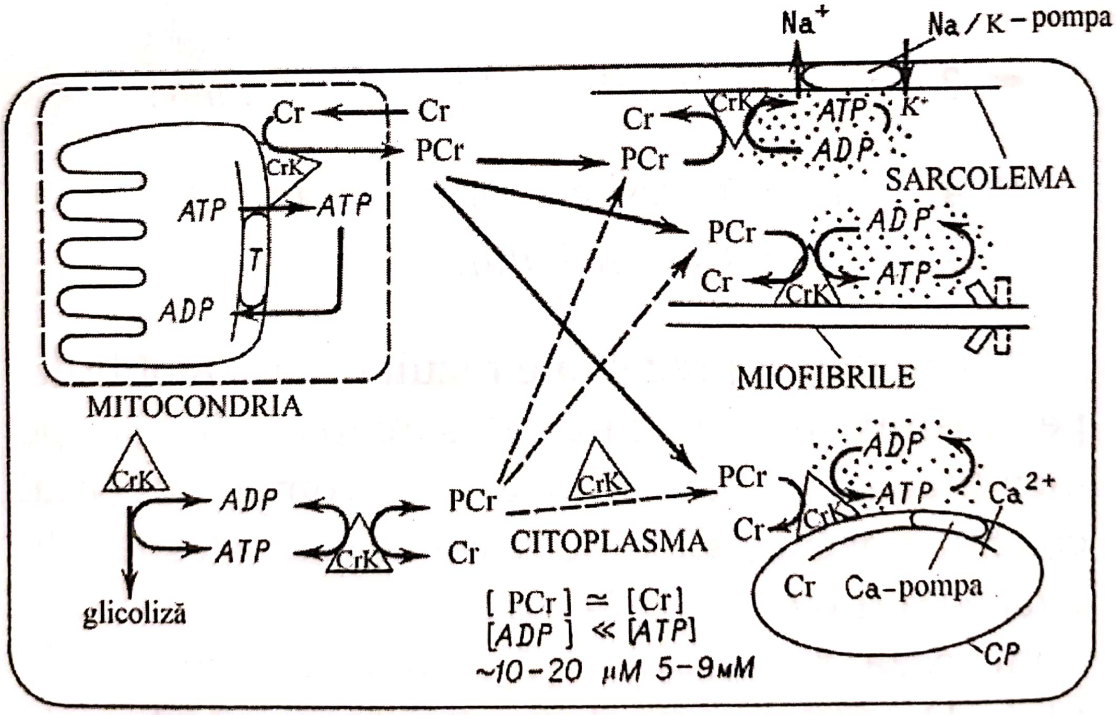
- **1** – *absorbția de sodiu în prezența a 0,3 mM Mg-ATP şi 5 mM fosfocreatină (sistem endogen de regenerare a ATP-ului);*
- **2** – *absorbția de sodiu în prezența a 2 Mm de Mg-ATP, 5 mM fosfoenolpiruvat şi 32 ME/mol piruvatkinază (sistem exogen de regenerare a ATP-ului);*
- **3** – *ca şi 2, concentrația Mg-ATP_ 20 mM;*
- **4** – *ca şi 1, ieşirea potasiului (rubidiului) în schimbul intrării sodiului.*

Din datele prezentate rezultă că în miofibrile, pe membrana reticulului sarcoplasmic şi pe membrana sarcolemală, comportamentul creatinkinazei se subordonează acelorași legități. În ambianța directă a *ATP*-azelor, aceste creatinkinaze catalizează reacția inversă – refosforilarea *ADP*-ului. Deoarece respectiva direcție a reacției de creatinkinază este preferată cinetic și termodinamic, aceste creatinkinaze sunt furnizoare ultraeficiente de energie de la fosfocreatină prin *pool*-urile locale de *ATP* şi *ADP*, pentru contracție și transportul

Scanned with OKEN Scanner

ionic. Eficiența superioară de funcționare a acestor sisteme se bazează, probabil, într-o măsură considerabilă, pe dispunerea în spațiul apropiat a centrilor activi ai creatinkinazei şi ai *ATP*-azelor, care, ipotetic (*cel puțin, pe membrane*), formează complexe multienzimatice, unde transmiterea directă a substratului (*sau distanța difuză scurtă pentru substraturi*) asigură funcționarea eficientă și interacțiunea tuturor componenților sistemului [337, 422, 437].

Datele consemnate în această trecere în revistă, confirmă, fără echivoc, prezența în celulele musculare (*cel puțin în celulele cardiace*), a căii fosfocreatinice de transport intracelular al energiei, ilustrată schematic în *Graficul 6*.



Graficul 6. **Calea fosfocreatinică de transport intracelular al energiei în celulele cardiace, ce indică compartimentarea izofermenților creatinkinazei şi a *ATP*-ului (*ADP*) în celule**

- ***C_r – creatină***
- ***PC_r – fosfocreatină***
- ***RS – reticul sarcoplasmic***
- ***T – translocaza***

CrC – creatinkinaza

Necesitatea existenței acestei căi este determinată, după toate probabilitățile, de următoarele cauze:

- **1** – *restricțiile de difuziune și organizarea structurală a sistemelor enzimatice impun compartimentarea ATP-ului; confirmări directe ale acestei compartimentări au fost obținute prin metoda RMN a combinațiilor fosforice* [284];

- **2** – *este unanim cunoscut faptul că toate reacțiile de utilizare a energiei sunt reversibile (inclusiv reacția actomiozinică ATP-azică) [118, 126, 211, 249, 250, 294] şi în prezența fosfatului și a ADP-ului, cu precădere, procesele de creare a gradientelor ionice pot fi ușor orientate în direcția sintezei de ATP (direcție ineficientă). Pentru funcționarea eficientă a acestora, trebuie create condiții de desfășurare a lor într-o unică direcție – nemijlocită, care necesită îndepărtarea*

Scanned with OKEN Scanner

rapidă a ADP-ului și menținerea valorii ridicate a potențialului fosfatic local;

- **3** – *produsul reacțiilor de ATP-ază, ADP-ul, este un inhibitor suficient de eficace al acestora și trebuie îndepărtat rapid, pentru a se asigura desfășurarea eficientă a transportului ionic și contracția [24, 198].*

Aceste trei circumstanțe au și servit, pe cât se pare, drept temei pentru crearea în natură a sistemelor creatinkinazice și a căii fosfocreatinice de transport al energiei, în cursul evoluției biochimice a celulelor musculare [34, 333, 363]. Există, de asemenea, date care demonstrează faptul că această cale de energie funcționează extrem de eficient în celulele creierului [44, 247, 375, 432].

O consecință importantă a existenței căii fosfocreatinice de transport al energiei o reprezintă potențialul sistemelor creatinkinazice intracelulare de a controla, în anumite condiții, forța de contracție și activitatea electrică a celulelor musculare.

Scanned with OKEN Scanner

1.6. SISTEMELE INTRACELULARE CREATINKINAZICE ŞI REGLAREA CONTRACȚIEI

Controlul contracției, realizat de sistemele creatinkinazei, incluzând creatina, fosfocreatina, izofermenții creatinkinazei și necesitând prezența de *ADP* sau *ATP*, în calitate de substraturi, a fost descris în lucrările noastre comune cu L.V. Rozenstrauh şi colaboratorii. Ulterior, a fost studiat suficient de detaliat de către G.-J. Vassott şi R. Ventura-Clapier [347, 406–408].

În celulele aerobe normale, sistemele de creatinkinază sunt *„invizibile"*, iar, din cauza activității ridicate a creatinkinazelor şi a concentrației intracelulare considerabile de fosfocreatină, alimentarea cu energie nu limitează contracția, care este reglată prin mecanisme de reglare calcică și prin procese de fosforilare [108, 283]. Totuși, influența reglării de către sistemele creatinkinazice se evidențiază destul de precis în prezența deficitului de energie, când alimentarea energetică devine un stadiu limitativ în procesul contracției musculare [348, 406].

În condițiile de păstrare a metabolismului mitocondrial oxidativ normal, una din modalitățile de creare a deficitului energetic o reprezintă spălarea creatinei și a fosfocreatinei din celulele inimii de broască, ale căror membrane sunt suficient de permeabile pentru aceste substanțe

Scanned with OKEN Scanner

[347, 406]. La o perfuzie îndelungată a inimii de broască în contracție, apare starea hipodinamică a mușchiului – forța lui de contracție se reduce de câteva ori [347, 406]. Reducerea forței de contracție se observă în paralel cu spălarea creatinei și cu scăderea conținutului de fosfocreatină în celule și nu corelează cu modificarea conținutului tisular general al *ATP*-ului, care, în aceste condiții, se reduce nesemnificativ [347, 406]. Prezența creatinei în lichidul de perfuzie frânează, chiar de la început, spălarea își protejează complet miocardul de apariția stării hipodinamice [406]. Adaosul de creatină în perfuzat și pătrunderea ei în celulele inimii hipodinamice duc la fixarea nivelului inițial de fosfocreatină și la restabilirea completă a forței de contracție la un nivel, practic, nemodificat al *ATP*-ului celular general [347, 406].

Aceste date, precum și rezultatele studierii inimii ischemice demonstrează faptul că și contracția miocardului nu interacționează cu modificarea *ATP*-ului intracelular general (*din cauza compartimentării*), legată fiind direct de modificarea conținutului de fosfocreatină, ce determină accesibilitatea *ATP*-ului la *pool*-urile reduse, însă de importanță funcțională, situate lângă miofibrile și membrane [34, 135, 284]. Introducerea directă a fosfocreatinei în perfuzat duce, de asemenea, la pătrunderea sa în celulele

Scanned with OKEN Scanner

inimii hipodinamice şi la creşterea semnificativă a forţei de contracţie [321, 322].

Totodată, în aceste experimente, s-a mai depistat şi acţiunea stimulativă considerabilă a fosfocreatinei asupra fluxurilor ionice transmembranare, prin sarcolemă, ce determină forma de ***platou***a potenţialului de acţiune; în plus, s-a înregistrat creşterea fluxului calcic lent, îndreptat spre interior, sub acţiunea fosfocreatinei [322]. S-a emis ipoteza că, această acţiune a fosfocreatinei, în procesele sarcolemale, poate fi intermediată prin reacţia sarcolemală de creatinkinază, posibil conjugată şi cu reacţia de proteinkinază [322].

Efecte absolut similare ale fosfocreatinei s-au observat şi în cazul când deficitul energetic al celulelor a fost obţinut prin inhibarea fosforilării oxidative în mitocondrii cu cianură [322, 407]. Scăderea forţei de contracţie, în acest caz,este, de asemenea, corelată cu reducerea conţinutului de fosfocreatină, şi nu cu cel al *ATP*-ului [407]. În cazul discutat, catecolaminele stimulatoare ale proceselor de transfer de calciu şi creşterea concentraţiei intracelulare a acestuia nu au fost capabile să refacă forţa de contracţie, probabil, din cauza deficitului energetic din micro-*pool*-urile localizate în imediata proximitate a unităţilor contractile [407]. Experimentele de extensiune rapidă şi de eliberare a muşchilor de sarcină au

Scanned with OKEN Scanner

demonstrat, în aceste condiții, prezența aparatului contractil în stare de rigiditate, ceea ce concordă cu supoziția apariției deficitului de *ATP* în miofibrile, unde *ATP*-ul este necesar pentru relaxare (*ca și pentru contracție*) [309, 408]. În prezența cianurii, adaosul de fosfocreatină a dus, de asemenea, la creșterea vizibilă a forței de contracție, precum și la refacerea platoului potențialului de acțiune [322, 337].

Pentru studierea rolului sistemelor creatinkinazice, de mare interes este și examinarea acțiunii analogilor creatinei asupra mușchilor. Până în prezent, a fost analizată acțiunea guanidinopropionatului și a ciclocreatinei asupra funcțiilor mușchilor scheletici și ale celui cardiac, prin introducerea acestor compuși în hrana animalelor de laborator [11, 111, 412]. Mușchii acestor animale sunt capabili de o dezvoltare mult mai redusă a contracției [111], însă capacitatea compușilor menționați de a se supune fosforilării în celule nu permite o interpretare univocă a acestor date [401]. Se pare că o informație mai precisă poate fi obținută prin cercetarea acțiunii acelor analogi ai creatinei care nu participă la reacție, însă pot sa inhibe specific creatinkinaza.

În inima animalelor cu sânge cald, creatina și fosfocreatina, practic, nu pătrund. În membrana superficială a acestor celule există un sistem de transport activ al creatinei împotriva gradientului

Scanned with OKEN Scanner

ridicat al concentrației ei, însă acest transport se realizează foarte lent [32]. Un astfel de transport de creatină este necesar, probabil, pentru echilibrarea excreției lente de creatină (*în mare, sub forma creatininei*)şi pentru menținerea conținutului ei celular constant, întrucât în aceste celule nu s-a detectat o activitate semnificativă a principalilor fermenți de biosinteză a creatinei – *arginina*: glicino-amidinotransferaza şi adenozina: guanidinoacetat-metiltransferaza, cu o activitate ridicată în ficat, precum şi în rinichi, locurile principale de biosinteză a creatinei [412]. Totuși, nu este exclus ca introducerea fosfocreatinei prin difuzia ei pasivă să se dovedească posibilă în unele stadii de lezare ischemică a celulelor cardiace, întrucât în ischemia cardiacă este tulburată, în primul rând, structura sarcolemei şi creşte permeabilitatea ei [145]. O asemenea posibilitate de aplicare practică a fosfocreatinei, pentru îmbunătățirea alimentării cu energie şi a funcției contractile a inimii ischemice, necesită, totuși, un studiu extrem de minuțios şi perseverent.

*

* *

Datele expuse în prezenta sinteză demonstrează rolul remarcabil pe care îl deține sistemul creatinkinazei în metabolismul energetic al celulelor musculare (*rol ce poate fi similar în*

Scanned with OKEN Scanner

celulele creierului), precum şi în reglarea contracției. Cu toate acestea, multe mecanisme moleculare ale funcționării lor nu sunt încă elucidate. Experiența acumulată în decursul deceniilor de către biochimiști de talie internațională, descoperirile realizate, interesul constant pentru domeniul creatinkinazei inimii impulsionează şi în viitor activitatea de cercetare.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 2

TEHNICILE CELULELOR ŞI FIBRELOR PERMEABILIZATE ÎN STUDIILE PRIVITOARE LA FUNCȚIA MITOCONDRIALĂ *IN VIVO*

2.1. APLICAȚIILE CELULEOR PERMEABILIZATE

În acest capitol vom descrie în detaliu tehnicile celulelor permeabilizate şi a fibrelor tratate cu saponină, precum şi aplicațiile acestora în studiul privind funcția mitocondrială *in vivo*, folosind experiența a mai mult de 15 ani de cercetare. Utilizarea saponinei în concentrații foarte mici (50-100 µg/ml), pentru permeabilizarea sarcolemei, permite păstrarea tuturor structurilor intracelulare intacte. Păstrarea intactă a funcției mitocondriale în fibrele musculare tratate cu saponină a fost analizată în această lucrare prin mai multe metode, cum ar fi *NADH*-ul şi studiile de fluorescență flavoproteinică, imagini prin fluorescență, microscopie confocală imuno-fluorescentă şi analiză respiratorie. În comparație

Scanned with OKEN Scanner

cu metodele tradiționale, care folosesc mitocondria izolată, analiza funcției mitocondriale utilizând tehnica celulelor permeabilizate şi a fibrelor tratate cu saponină are mai multe avantaje:

- *1 – sunt necesare mostre foarte mici de țesut*
- *2 – pot fi analizate toate populațiile de mitocondrii celulare*
- *3 – important rămâne faptul că mitocondria este studiată în condițiile sale naturale*

Prin aceste metode, rezultatele cercetării arată existența unui fenomen nou: dependența țesutului de mecanismul de reglare a respirației mitocondriale şi activarea respirației prin proteoliză selectivă. Acest fenomen se explică prin interacțiunea mitocondriei cu alte structuri celulare *in vivo*. Sunt discutate apoi detaliile studiilor experimentale care folosesc aceste tehnici şi probleme de analiză cinetică. Sunt oferite, de asemenea, exemple de aplicații clinice pe scară largă ale acestor metode.

*

* *

Cercetările privind funcția mitocondrială în țesutul muscular în condiții diferite a fost – şi este încă – obiectiv al numeroaselor studii în bioenergetica celulară. Cel mai adesea, asemenea

Scanned with OKEN Scanner

studii au în vedere țesuturi sau organe întregi. Spectroscopia nucleară cu rezonanță magnetică este tot mai mult utilizată pentru evaluarea concentrației intracelulare de metaboliți, care controlează activitatea respiratorie. Un avantaj important al acestei abordări este că arhitectura celulară şi interacțiunile dintre diversele compartimente ale celulei sunt bine păstrate, iar mitocondria poate fi studiată *in situ*. Principalul dezavantaj al acestei metode *in vivo* este că mediul extramitocondrial nu poate fi controlat. Nu este posibil să schimbi mediul intracelular (de exemplu, să se elimine substraturile respiratorii nedorite) în țesutul viu; mai mult, nu este posibilă nici măcar determinarea concentrațiilor de metaboliți care, după cum se ştie, reglează respirația. Una dintre principalele caracteristici ale mitocondriei este dependența de consumul de oxigen pentru concentrația liberă a *ADP*-ului. Cea din urmă, totuşi, poate fi doar calculată (nu măsurată direct), utilizând date *RMN* şi, de asemenea, se pot face câteva presupuneri care nu sunt, întotdeauna, valide (echilibrul temporal şi spațial al reacției creatinei, distribuția citozolică omogenă a PH-lui, ATP-ului, fosfocreatinei, creatinei *etc.*).

O altă variantă care a fost testată de peste 40 de ani este folosirea mitocondriei izolate. Această metodă permite un control perfect al compoziției

Scanned with OKEN Scanner

mediului din jurul organismelor, fiind o metodă demnă de încredere, rapidă şi ieftină. Totuşi, izolarea mitocondriei, prin omogenizarea țesutului şi sedimentarea ei prin centrifugare, poate afecta serios proprietățile structurale şi funcționale ale organitelor mitocondriei.

Distrugerea arhitecturii celulare înseamnă alterarea parametrilor care se referă la interacțiunea mitocondriei cu spațiul extramitocondrial şi distrugerea structurii organizate a citoplasmei. O importanță aparte o prezintă cazul în care mitocondria este separată de țesutul deja distrus printr-un proces patologic. Mai mult, datorită procesului de izolare, nu este posibilă investigarea întregului țesut al populației mitocondriale.

Cu aproximativ trei decenii în urmă, a fost propusă o nouă metodă de studiu a mitocondriei, care combină avantajele mai multor abordări. [402] Conform acestei metode, folosind fibre musculare permeabilizate cu saponină, funcția întregii populații mitocondriale poate fi studiată *in situ*, fără a izola mitocondria de țesut. Este o tehnică ce oferă posibilitatea de a controla cu precizie mediul extramitocondrial. Un fapt demn de reținut este că metoda poate fi aplicată pe bucăți de țesut extrem de mici, ceea ce face posibilă studierea funcției mitocondriale pe mostre la fel de mici, aspect deloc

Scanned with OKEN Scanner

de neglijat atunci când materialul este limitat (mostre pentru biopsie, țesut de animale transgenice scumpe, culturi de celule). De asemenea, utilizând această tehnică, pot fi studiate proprietăți ale mitocondriei care, în condițiile izolării acesteia, s-ar putea pierde.

Ideea folosirii unui detergent pentru permeabilizarea plasmalemei, în investigarea funcționării membranei intracelulare, am valorificat-o dintr-o lucrare a lui Endo şi Kitazawa [104]. Aceşti autori au folosit o concentrație slabă de saponină (50 µg/ml) pentru permeabilizarea muşchiului cardiac şi scheletic. Ei au descoperit că spațiul intracelular este deosebit de accesibil pentru Ca^{2+}, Mg^{2+}, *ATP* şi *EGTA*, ceea ce înseamnă că sarcolema a fost perforată, pierzându-şi integritatea. În acelaşi timp, însă, reticulul sarcoplasmatic din fibrele cardiace tratate cu saponină este, în esență, similar cu cel din fibrele scheletice, demonstrându-şi integritatea sistemului membranos intracelular.

Acțiunea selectivă a digitoninei şi saponinei, glucozei de origine vegetală, care conțin steroid hidrofobic şi rădăcini de glucoză hidrofilică, poate fi explicată prin compoziția diferită a membranei celulare în lipide. Saponina şi digitonina, datorită steroidului hidrofobic, au mari afinități față de colesterol şi extrag, de preferință, colesterolul din

Scanned with OKEN Scanner

membrane, atacând, îndeosebi, membranele bogate în colesterol, cum ar fi plasmalema [125]. Reticulul endoplasmatic are un conținut mai mic în colesterol; iar membrana mitocondrială internă conține şi mai puțin din această lipidă [80, 192]. Ca rezultat, saponina declanşează efecte mult mai puțin dăunătoare asupra reticulului endoplasmatic şi a mitocondriei, iar, pentru distrugerea lor, sunt necesare concentrații mai mari de detergent.

Aceste bine ştiute diferențe, în conținutul de colesterol al plasmalemei, al membranelor interioare şi exterioare, alcătuiesc premizele alegerii concentrației necesare de saponină şi digitonină pentru a dizolva unele membrane şi pentru a le păstra pe altele intacte, aşa cum s-a precizat mai sus.

Astfel, pentru permeabilizarea sarcolemei spre a pregăti mitoplastele cu membrana exterioară înlăturată, cea internă rămânând intactă şi pentru a prepara aşa-numitele particule submitocondriale, trebuie folosite 0,05 sau mai mult de 10 *Mg/ml* de saponină, respectiv digitonină [61, 104, 344, 402].

Recent şi deosebit de surprinzător este faptul că grupul lui Kuchmerick nu a reuşit [430] să calculeze această diferență de concentrație, pentru a explica afinitatea mitocondrială scăzută a *ADP*-ului în celulele permeabilizate sau în fibrele

Scanned with OKEN Scanner

tratate cu saponină, prin rezultatele obținute pentru particulele submitocondriale, care, de asemenea, manifestau o afinitate scăzută pentru *ADP*. [61]

Totuşi, chiar şi pe vremea când Albert Lehninger, care a început să folosească acest agent, s-au înregistrat diferențe de mai mult de 100 de ori în concentrația detergentului folosit, cu consecințe clare asupra structurii celulare, demonstrate în mod direct şi experimental vreme de 30 de ani [9, 80, 104, 125, 192, 229, 202, 351, 392]. De fapt, când particulele submitocondriale sunt pregătite folosind concentrații mari de digitonină, enzimele mitocondriale şi cofactorii sunt eliberați, iar afinitatea scăzută a acestor sisteme pentru *ADP* poate fi legată de factorii cinetici, cum ar fi reîncărcarea slabă a veziculelor cu *ADP* sau *ATP*, fără afectarea proteinelor membranei. Chiar după izolarea membranei, adeninnucleotid-translocaza păstrează o afinitate mare pentru *ADP* [411].

Metoda de investigare a funcției mitocondriale în preparatul permeabilizat a fost validată folosind următoarele criterii:

- **1** – *păstrare în stare bună a morfologiei mitocondriei*
- **2** – *permeabilizarea completă a plasmalemei*
- **3** – *funcții mitocondriale normale*

Scanned with OKEN Scanner

S-au făcut diferite studii privind preparatele permeabilizate [9, 202, 229, 351, 392, 402]. Altschuld şi alţii [9] au descoperit că - un lucru important - cardiomiocitele, tratate cu digitonină, îşi păstrează foarte bine morfologia. De altfel, cum era de aşteptat, sarcolema lipseşte, iar mitocondria rămâne intactă şi îşi menţine aparenţa de celulă netratată. Sarcomerii celulelor tratate cu digitonină sunt bine aliniaţi, cu o uşoară îngroşare a liniilor Z. Reticulul sarcoplasmatic pare intact în aceste celule şi numeroase mitocondrii rămân legate de-a lungul suprafeţei. Mitocondria pare a fi bine ataşată de celulă prin filamente intermediare şi alte legături, după ce a trecut prin etapele de spălare şi fixare. Micrografiile de scaner indică aceste mitocondrii de suprafaţă ca particule sferice cu legături groase filamentoase.

Investigaţia cu microscopul electronic a fibrelor venticulare, tratate cu saponină [351, 402], au demonstrat ultrastuctura intactă a mitocondriei şi a reticulului sarcoplasmatic, chiar când sarcolema este integral îndepărtată. Se ştie că membrana mitocondrială exterioară are o sensibilitate crescută la saponină şi digitonină, comparativ cu membrana interioară; şi, în aceeaşi măsură, populaţia mitocondrială în fibrele permeabilizate cu saponină a dovedit o bună

Scanned with OKEN Scanner

conservare a membranei mitocondriale exterioare [351]. În mod similar, cardiomiocitele izolate, tratate cu saponină, păstrează morfologia mitocondrială normală, în ciuda absenței sarcolemei [329]. Toate aceste date demonstrează clar că tratamentul de permeabilizare cu concentrație slabă de saponină sau digitonină nu afectează ultrasuctura mitocondrială. Dar, cel mai important este faptul că permeabilizarea fibrelor nu afectează membrana mitocondrială externă, atâta timp cât adăugarea de citocrom *c* exogen nu are nici un efect asupra respirației fibrei [351]. De asemenea, creatina influențează în mod semnificativ activitatea respiratorie a fibrelor ventriculare, la concentrații de *ADP* sub valoare maximă, ceea ce dovedeşte prezența unei creatinchinaze mitocondriale active. De asemenea, în fibrele muşchiului cardiac creatinchinaza este fixată în membrana reticului sarcoplasmatic [260], ceea ce demonstrează caracterul intact al acestei structuri.

Dovezile morfologice ale stării intacte a populației mitocondriale în celulele muşchilor permeabilizați cu saponină au fost oferite de grupul Penman [229, 300]. Acesta a folosit un tratament cu 100 µg/ml de saponină pentru permeabilizarea celulelor musculare şi microscopul cu electron liber pentru surprinderea

Scanned with OKEN Scanner

interacțiunilor şi a arătat că, în aceste condiții, nu numai membrana externă, ci şi contactele sale cu citoscheletonul sunt perfect păstrate [229, 300].

O altă dovadă a permeabilizării complete a sarcolemei este absența barierelor între spațiile intracelulare şi extracelulare. Cardiomiocitele digitonin-lizate pierd 98% din lactatul de hidrogenază inițial, ca şi mioglobina şi alte componente citozolice, dar nu citocromii mitocondriali [9]. Rezultate similare au fost obținute în fibrele muşchiului ventricular [402] şi scheletic [202]. Numeroase experimente efectuate pe fibrele tratate cu saponină au demonstrat că structurile membranei intracelulare, cum ar fi microfilamentele şi reticulul sarcoplasmatic, răspund rapid la schimbarea concentrației de ioni, de adeninnucleotide, de fosfocreatină, *EGTA*, aminoacizi *etc.* Acest lucru pune în lumină faptul că structura spațiului intracelular în țesuturile permeabilizate cu saponină şi în celule poate fi bine controlată prin aditivi externi.

Una din mărturii este şi stadiul funcțional al mitocondriei în preparatele permeabilizate. Conținutul de citocrom aa_3 în fibrele cardiace este similar cu cel din muşchiul cardiac [402]. Tratarea cu digitonină nu produce nici o eliberare semnificativă de enzimă a matricei mitocondriale din cardiomiocite [235], iar producerea enzimei în

Scanned with OKEN Scanner

timpul tratării cu saponină a muşchiului scheletic, este foarte slabă [202]. Activitatea oxidantă a preparatelor permeabilizate depinde foarte mult de prezența substraturilor respiratorii [402]. În fibrele tratate cu saponină, mitocondria este capabilă să utilizeze diferite substrate [201, 202], ceea ce sugerează că toate structurile mitocondriale sunt active. Nu a fost observată nici o diferență față de mitocondria izolată cu privire la oxidarea diferitelor substrate şi la diferiți inhibitori [202]. *ADP*-ul stimulează respirația preparatelor permeabilizate, astfel că indicatorul de control al acceptării este de 5–7 pentru muşchiul cardiac al diferitelor specii. Carboxiatractilozida, un inhibitor al adeninnucleotid-translocazei, suprimă complet respirația stimulată a *ADP*-lui în celulele permeabilizate. Aceste rezultate demonstrează o relație foarte strânsă între oxidare şi procesele de fosforilare. Măsurarea directă a sintezei *ATP*-ului în celule permeabilizate cu digitonină [291] au arătat un nivel de *ATP*/0 foarte asemănător cu cele obținute în mitocondria izolată, după utilizarea aceloraşi substrate respiratorii.

Starea intactă a mitocondriei şi păstrarea în bune condiții a funcției mitocondriale, după permeabilizare, nu a fost observată doar în țesuturile musculare, ci şi în alte preparate, de

Scanned with OKEN Scanner

exemplu în organismele unicelulare eucariotice [409].

Astfel, toate demonstrațiile arată că proprietățile mitocondriei *in situ*, în preparate permeabilizate, sunt bine păstrate. Acest fapt este confirmat şi descris în continuare, odată cu prezentarea unor noi rezultate experimentale. Analiza funcției mitocondriale în fibrele tratate cu saponină este îndeajuns de eficace pentru a releva modificările, în diferite forme, ale patologiei cardiace sau musculare [202, 338, 404].

2.2. METODE DE PREPARARE A FIBRELOR PERMEABILIZATE ŞI DE DETERMINARE A FUNCȚIEI MITOCONDRIALE IN VIVO

2. 2. 1. Prepararea fibrelor musculare în experimente

Fibrele permeabilizate sunt preparate din mostre de țesut de la animale de laborator sau biopsii de la muşchi umani, conform metodelor descrise în [329, 332, 338, 339, 343, 351, 353, 401, 402, 404]. În concluzie, pentru a prepara fibrele permeabilizate din muşchii cardiaci şi scheletici de la animale mici de laborator, acestea sunt anesteziate cu pentobarbital de sodiu (50 mg/kg corp, i.p.) şi tratate cu heparină (1500 UI/kg .

Scanned with OKEN Scanner

corpi.v.), iar inima excizată, încă bătândă, este cufundată în soluția **A** răcită. Inimile răcite sunt tăiate în jumătăți şi separate în fascicule (de 2-4 mm lungime şi 1-1,5 mm diametru, 5-7 mg masă umedă), tăiate din endocardul ventriculului stâng, de-a lungul fibrei, pentru a evita distrugerea mecanică a celulelor. Fasciculele de fibră musculară (3-4 mm lungime, aproximativ 1mm diametru) pot fi, de asemenea, prelevate din muşchiul *soleus* (oxidativ, de contracție lentă), din *gostrocnemius alb* (glicolitic, de contracție rapidă), *gastrocnemius roşu* (oxidativ-gligolitic, de contracție rapidă), *plantaris* (oxidativ-gliglolitic, de contracție rapidă, alb), *tibialis* anterior (de contracție rapidă, oxidativ-glicolitic), *cvadriceps* (oxidativ-gligolitic, mixt) şi alți muşchi. Utilizându-se forcepsuri cu capete ascuțite sau ace, fibrele musculare se separă unele de altele, lăsându-se numai mici arii de contact. După aceea, fibrele se transferă în vase cu soluția *A* răcită (în gheață), conținând 50 µg saponină *per* ml, se incubează şi se amestecă uşor, 30 de minute, pentru solubilizarea completă a sarcolemei. De notat că această concentrație este de 200 de ori mai mică decât cea utilizată de Lehninger în 1967 [61]. Fibrele permeabilizate sunt apoi spălate în soluția ***B*** timp de 10 minute; această procedură de spălare este repetată încă de două ori, pentru îndepărtarea completă a metaboliților,

Scanned with OKEN Scanner

în special a urmelor de *ADP* liber. Îndepărtarea totală a *ADP*-ului liber poate fi cu uşurinţă constatată din înregistrările respiraţiei,care ar trebui să arate viteze foarte reproductibile ale Stării iniţiale 2 (desemnate ca v_o), insensibile la inhibarea cu atractilozidă (a se vedea mai jos).

2.2.2. Izolarea fibrelor musculare umane

Metoda este aceeaşi cu cea descrisă mai sus, cu mici modificări. Mostra de muşchi scheletic uman pentru biopsie (50-100 mg masă umedă muşchi *vastus lateralis*) este transferată imediat în 25 ml de soluţie izotonică de NaCl răcită la gheaţă. Fasciculele de fibre sunt izolate prin atenta disecţie mecanică, în soluţie relaxantă ***A***, a aproximativ 50 mg de ţesut muscular, în pachete de 5-10 µm lungime şi 100 până la maxim 250 µm grosime (conţinând fiecare între 2-5 fibre).Fibrele musculare umane permeabilizate cu saponină sunt preparate prin agitarea uşoară, timp de 30 de minute a acestor pachete în soluţie relaxantă suplimentată cu 50 µg/ml de saponină. Apoi saponina este înlăturată prin incubarea fibrelor timp de 10 minute (agitare uşoară) în mediul destinat măsurării respiraţiei, conţinând 5 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl, 100 mM manitol, 10 mM KH_2PO_4, 0,5

Scanned with OKEN Scanner

mM Na_2EGTA, 60 mM Tris-HCL (pH 7,4), suplimentat cu 10 mg/ml de albumină serică liberă de acizi graşi esenţiali. Pentru măsurători oxigrafice ulterioare (în limita a 5 ore), fibrele pot fi păstrate în această soluţie la 0°C. Stabilitatea pe termen lung a acestor preparate poate fi îmbunătăţită (până la câteva zile) prin păstrarea fasciculelor de fibre izolate în soluţie relaxantă. Toate aceste proceduri trebuie făcute la gheaţă.

2.2.3. Izolarea şi cultura miocitelor cardiace adulte şi a cardiomiocitelor-fantomă

În experimentele întreprinse sunt folosiţi şoareci masculi *Wistar,* cântărind 300-350g. Miocitele tolerante la calciu sunt izolate prin perfuzare cu un mediu ce conţine colagenază, într-un aparat Langendorff, în condiţii sterile. Inimile sunt perfuzate cu aproximativ 100 ml soluţie liberă de Ca (soluţie iniţială), la viteză de perfuzare de 12-14 ml/min, pH 7,3, 37°C, saturată cu un amestec de gaz de 95% O_2 – 5% CO_2 şi conţinând, în µM: NaCl 70, KCl 10, $KHPO_4$ 4, $NaHCO_3$ 15, $MgCL_2$ 1, glucoză 11, sucroză 120 şi piruvat 2. Apoi, inimile sunt perfuzate aproximativ 30 de minute, la 4 ml/minut cu aceeaşi soluţie, la care se adaugă 1%

Scanned with OKEN Scanner

albumină serică bovină (*BSA*) şi 1mg/ml de colagenază D (Boehringer).

După aceea, ventriculele sunt aşezate pe farfuriile Petri (100 mm diametru) cu 10 ml din această soluție şi 10 ml de soluție inițială cu 2% albumină serică bovină (*BSA*). Cardiomiocitele sunt apoi despărțite cu grijă folosindu-se o racletă de cauciuc (*rubber policeman*)şi aspirare cu pipetă şi viceversa. Suspensia de cardiomiocite este centrifugată la 30 x g pentru 60 de secunde, iar miocitele sunt spălate de 3 ori şi sedimentate timp de 10 minute în soluția inițială cu 2% *BSA*. Cardiomiocitele sunt transferate progresiv într-un mediu calciu-tolerant prin trei spălări şi sendimentare, amestecând soluția inițială cu 2% BSA şi mediu sigma 199 în proporții de 3/1, 3/2 şi, respectiv, 3/3. Aproximativ 1 până la 1,5 ori 10^6 cardiomiocite calciu-tolerante în 15 ml mediu de cultură 0 (Sigma 199 cu insulină 10^{-9} M, sucroză 55 mM, Hepes 20 mM, Na HCO_3 10 mM, penicilină 100 UI/ml şi streptomicină 0,1 mg/ml) sunt puse într-o farfurie Petri şi incubate la 37°C într-o atmosferă ce conține 5% CO_2 şi 95% aer. După 2-3 ore de cultură, cardiomiocitele sunt spălate o dată cu mediu de cultură 0. Cardiomiocitele calciu-tolerante tip tijă (*rod shaped cardiomyocytes*) sunt apoi incubate timp de 18 ore, până la tratamentul cu saponină.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a prepara cardiomiocitele-fantomă fără miozină [188], cardiomiocitele sunt extrase, prin sedimentare, din mediul de incubare şi introduse în soluția **A**, formând o suspensie (a se vedea mai jos).

Pentru permeabilizarea sarcolemei, se adaugă saponină în concentrație de 50 µg/ml şi suspensia este incubată, pentru 30 de minute, cu amestecare uşoară şi spălată prin sedimentare, de 5 ori, în soluția **B** (cardiomiocite permeabilizate de control) sau în soluția **C** (vezi, mai jos), când cardiomiocitele-fantomă sunt pregătite. Cardiomiocitele spălate sunt transferate în soluția **D**, cu care formează o suspensie conținând 800 mM KCl, pentru extragerea miozinei, şi incubate pentru 30 de minute. După aceea, cardiomiocitele-fantomă sunt sedimentate şi spălate, din nou, de 5 ori, în soluția **B**. Extragerea miozinei este controlată prin determinarea concentrației de proteine în suspensie, înainte de extracție şi în extracte, după sedimentare. De obicei, extractele conțin 15-20% din totalul de proteine.

În experimentele cu cardiomiocite, centrifugarea nu este niciodată utilizată, pentru a evita deteriorarea celulelor.

Scanned with OKEN Scanner

2 2.3.1. *Studierea respirației*

Respirația fibrelor permeabilizate se măsoară de obicei la 25°C, utilizând un oxigraf Oroboros de înaltă rezoluție (Anton Paav, Graz) sau folosind electrodul cu oxigen Yellow Spring Clark în soluția **B**, conținând substrate respiratorii (vezi, mai jos) şi 2 mg/ml de albumină serică bovină. Solubilitatea oxigenului la această temperatură este considerată 215 nmoli O_2/ml [161]. Se pot folosi, alternativ, soluții izoosmotice având ca baze sucroză sau manitol, utilizate în studierea mitocondriilor izolate.

2.2.3.2. *Soluții*

Compoziția soluțiilor utilizate este bazată pe conținuturile ionice ale citoplasmei celulelor musculare (vezi, referința 19).

- **Soluția A**

✓ conține în mM: Ca K_2EGTA 2,77; K_2EGTA 7,23; $MgCl_2$ 6,56; ditriotreitol (DTT) 0,5; K-MES 50; imidazol 20; taurină 20; Na_2ATP 5,3; fosfocreatină 15 pH 7,1 şi adusă la 25°C

- **Soluția B**

✓ conține în mM: CaK2EGTA 2,77; K2EGTA 7,23; MgCl2 1,38; DTT 0,5; K-MES 100; imidazol 20; taurină 20; K2HPO4 3 şi

Scanned with OKEN Scanner

piruvat 5 (sau glutamat 5) + malat 2, pH 7,1 la 25°C

- **Soluția C**

✓ conține în mM: taurină 20; ditiotreitol (DTT) 0,5 $MgCl_2$ 10, ATP 10, K – MES80, HEPES 50, pH 7,1 cu KOH

- **Soluția D**

✓ conține în mM: taurină 20, DTT 0,5, $MgCl_2$ 10; ATP 10; KCL 800, HEPES 50, pH 7,1 cu KOH

- **Soluția KCl pentru citocromul c**

✓ conține în mM: KCL 125; HEPES 20, glutamat 4, malat 2, Mg acetat 3, KH_2PO_4 5, EGTA 0,4 şi DTT 0,3, pH 7,1 la 25°C şi 2 mg de BSA/ml

2.2.4. Înregistrarea modificărilor de fluorescență în mitocondriile din fibrele permeabilizate

Informații importante privind funcția mitocondrială în fibrele permeabilizate cu saponină pot fi obținute prin măsurarea fluorescenței NAD(P)H-ului şi a flavoproteinelor fluorescente [200, 429]. La o excitare laser, de 325 nm HeCd, schimbările de fluorescență detectabile

Scanned with OKEN Scanner

la o emisie de 450 nm pot fi atribuite, aproape exclusiv, NADH-ului mitocondrial. Pe de altă parte, fluorescența flavoproteinelor, semnalizată la 520 nm, utilizând excitație laser de 454 nm ion de argon, este cauzată în principal de forma oxidată a α-lipoamid-dehidrogenazei, fiind în strâns echilibru redox cu sistemul mitocondrial NAD [199]. Pentru detectarea acestor semnale de fluorescență în fasciculele fibrelor musculare permeabilizate cu saponină se foloseşte următorul ansamblu experimental, descris în detaliu la [200].

Se imobilizează (cu vată de sticlă) între 2 şi 5 mg de fibre permeabilizate masă umedă într-un tub de cuarț fotoecranat şi se perifuzează cu 1 ml/min într-un mediu utilizat pentru măsurători oxigrafice. Fluorescența NAD(P)H-ului este excitată la 325 nm, folosind fasciculul de 8 mW de la un laser Omnichrom OMI-2056 HeCd cu lungime de undă dublă. Fluorescența flavoproteinelor este excitată la 454 nm, utilizând un laser de 75 mw Omnichrom OMI-523 AP cu ioni de argon. Lumina excitantă este ghidată către eşantionul imobilizat, cu o fibră de cuarț. Lumina fluorescentă este monitorizată printr-un spectrofluorimetru Shimadzu RF 5001 conectat la 40° (în raport cu raza de excitare) cu un ghid de lumină cu cuarț (*quartz light guide*) SchottMainz, de 6 mm diametru interior, în camera de perifuziune,

Scanned with OKEN Scanner

la o lungime de undă a emisiei de 450 nm NAD(P)H fluorescență sau 520 nm (fluorescență flavoproteinică). Această metodă permite determinarea schimbărilor stărilor redox ale sistemului mitocondrial NAD pe substrat ADP şi adaosuri de inhibitori.

2.2.5. Microscopie confocală imuno-fluorescentă în cardiomiocitele permeabilizate şi în cele fantomă

Dubla marcare a desminei şi a mitocondriilor se face pe cardiomiocite intacte şi cardiomiocite-fantomă în suspensie. Folosim o metodă modificată Granger şi Lazarides [129]. Fixarea celulelor se face prin incubare, timp de 15 minute, cu paraformaldehidă3% proaspăt preparată într-o soluție tampon fosfat salin (*PBS*) la 37°C. Permeabilizarea cardiomiocitelor intacte se face prin incubare în 1% triton în *PBS*, timp de 30 de minute. Cardiomiocitele-fantomă nu au nevoie de tratament cu triton fiind deja permeabilizate. Apoi, cardiomiocitele intacte şi cele fantomă sunt incubate cu anticorpi antidesmină policlonali pentru 30 de minute la 37°C. În continuare, toate mostrele sunt incubate cu anticorpi secundari conjugați cu rodamină F (ab') 2 şi apoi cu soluție

Scanned with OKEN Scanner

de noniloranj (0,1 µg/ml) timp de 15 minute. În acest timp, celulele sunt spălate de 3 ori, vreme de 15 minute, în *PBS* şi, apoi, în apă. În sfârşit, celulele marcate în suspensie sunt depozitate în recipiente acoperite şi, mai apoi, introduse într-un amestec de moviol şi glicerol, la care s-a adăugat 1,4-diazobociclo-(2,2,2)-octan.

Mostrele sunt studiate la microscopie confocală realizată prin sistem LSSM 410 Zeiss de microimagine confocală, echipat cu un plan apo x 63 imersie uleioasă, NA 1,40 lentile pentru obiectiv. Micrografiile din această lucrare reprezintă secțiuni optice de 0,5 µm grosime.

2.2.6. Câteva rezultate importante obținute prin folosirea tehnicii fibrelor permeabilizate

2. 2.6.1. Caracterul intact al funcției mitocondriale în fibrele musculare permeabilizate cu saponină; schimbările în fluorescență dependente de substrat

În *Figura 1* sunt puse în evidență răspunsurile tipice ale fluorescenței NAD(P)H (traseul de sus) şi ale fluorescenței flavoproteinelor (traseul de jos) pentru fibrele de *vastus lateralis* uman, la

Scanned with OKEN Scanner

adăugarea de octanoilcarnitină + malat, ADP7 glutamat şi cianură.

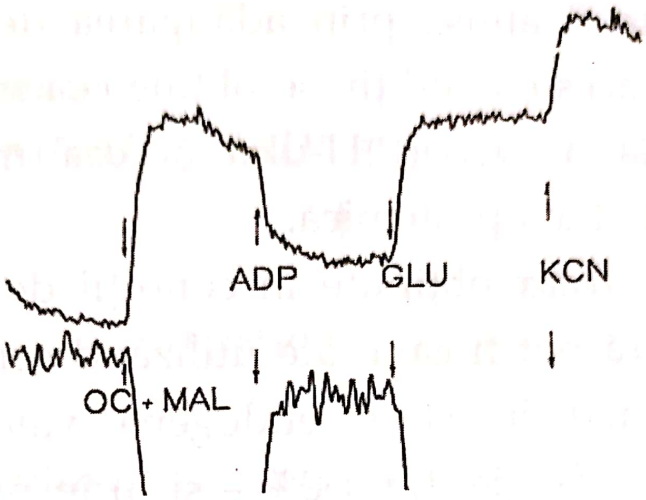


Fig. 1. **Schimbările de fluorescență ale NAD(P)H (traseul superior) şi ale flavoproteinelor fluorescente (traseul inferior) în fibrele musculare scheletice umane permeabilizate cu saponină. Adiții de: 1 mM octanoilcamitină (OC) şi 5mM malat (MAL), 1mM ADP, 10 mM glutamat (GLU), 4 mM KCN.**

Adăugarea de substrat (1mM octanoilcarnitină şi 5mM malat) duce la creşterea fluorescenței NADH-ului şi scăderea fluorescenței flavoproteinelor. Adaosul ulterior de ADP (1mM) a cauzat o reoxidare a sistemului mitocondrial NAD, vizibilă ca descreştere a fluorescenței NAD(P)H-ului şi creştere a fluorescenței flavoproteinelor. Acesta este rezultatul stimulării fosforilării mitocondriale oxidative.

Îmbunătățirea rezervei de echivalenți reductori în prezența a 10mM glutamat a produs

în aceste condiții o sporire a reducerii sistemului NAD mitocondrial, vizibilă ca augmentare în fluorescența NAD(P)H şi scădere a fluorescenței flavoproteinelor. Reducerea maximală a sistemului NAD poate fi atinsă prin adăugarea de cianură (4mM). În aceste condiții, se obține cea mai înaltă fluorescență a NAD(P)H-ului şi cea mai joasă fluorescență flavoproteinică.

Stările *redox* obținute în condiții de reducție intermediară pot fi calibrate utilizând semnale de fluorescență,a) în stare endogenă valoarea de referință a reducției fiind 0% – şi b) în prezența a 10 mM glutamat şi 4 mM cianură valoarea de referință a reducției fiind 100%. Prin urmare, această metodă permite detectarea, la un influx bine definit al echivalenților reductori (activitate constantă a dehidrogenazelor primare), a schimbărilor corelate cu vitezele fosforilării oxidative mitocondriale: o creştere a ritmului respirației conduce la o stare redox scăzută în sistemul NAD mitocondrial (scădere a fluorescenței NAD(P)H-ului şi creştere a fluorescenței flavoproteinice).

Pe de altă parte, la un nivel definit al fosforilării oxidative, modificările dehidrogenazelor primare (de exemplu activarea prin ioni de Ca) ar trebui să producă o reducție sporită a sistemului NAD mitocondrial (creştere a fluorescenței

Scanned with OKEN Scanner

NAD(P)H-ului şi scădere a fluorescenței flavoproteinelor). Acest comportament poate fi vizualizat în următoarea diagramă de flux a echivalenților reductori:

dehidrogenaze
primare = $(NADH/NAD^+)$ = *lanț respiratoriu* = O_2

↕

$(FpH_2/Fp^*)_{a\text{-}lip\ DH}$

În plus, în condiții comparabile ale măsurătorilor fluorescenței, din schimbările semnalului maximal de fluorescență este posibilă estimarea nivelului relativ al fluorocromilor dintr-o mostră de fibră musculară [199, 200, 429]. Acest nivel depinde de conținutul de mitocondrii şi poate fi corelat cu activitatea citratsintazei.

Comportamentul în opoziție al fluorescențelor NAD(P)H şi flavoproteinice în oxido-reducerea sistemului NAD mitocondrial permite monitorizarea coeficienților ambelor semnale (ca indicatori foarte sensibili ai schimbărilor în funcția mitocondrială) aplicate anterior pe suprafața mostrelor de țesut înghețat [193].

Scanned with OKEN Scanner

În *Figura* 2, avem imagini microscopice ale ratei de fluorescență (imagine flavoproteină – 436nm excitație, 525nm emisie) / (imagine NAD(P)H – 366nm excitație, 450nm emisie) în 2 fibre musculare umane unice (*single*) permeabilizate **cu saponină.**

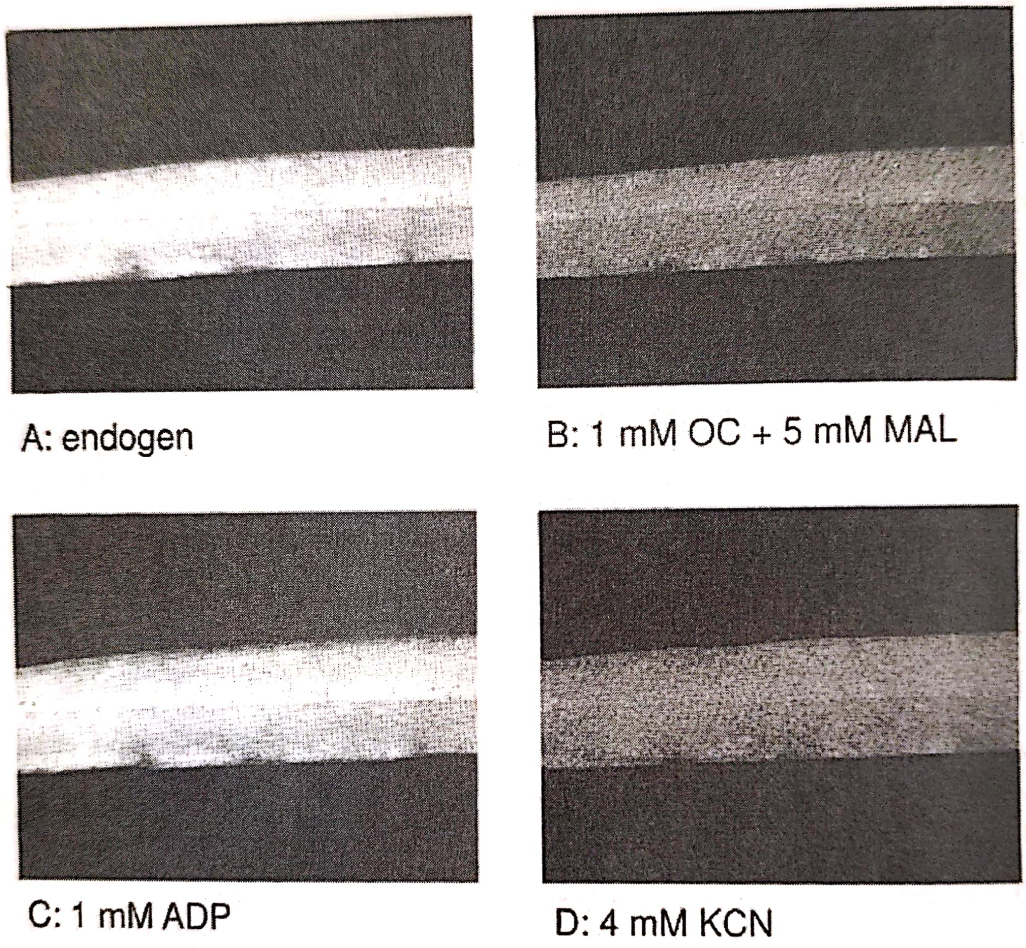


***Fig.* 2. Imagini digitale ale ratei fluorescenței (Fp/PN) fibrelor musculare scheletice umane permeabilizate cu saponină. Un fascicul de 2 fibre a fost fixat la ambele capete într-o cameră conținând 300µl mediu pentru măsurători oxigrafice. Adaosuri ca în Fig.1. Fiecare imagine digitală a fost obținută utilizând un microscop Olympus IX 70 echipat cu cameră Kappa CCD CF8/1 DXC. Condiții de măsurarea fluorescenței: fluorescență NAD(P)H (PN) – 366nm excitație şi 450nmemisie; fluorescență flavoproteinică (Fp) – 436nm**

Scanned with OKEN Scanner

excitație şi 525nm emisie. Imaginile au fost procesate de un software Zeiss LSM. Mărire: 100 ori.

Grupul de fibre a fost fixat la ambele capete şi incubat în mediu pentru măsurători oxigrafice. Imaginile de fluorescență au fost obținute utilizând un Olympus IX70 cu microscop invers echipat cu cameră CDD Kappa CF 8/1 DXC. Pentru procesarea imaginii ratei digitale (fluorescență flavoproteinică/fluorescență NAD(P)H) s-a folosit *software*-ul LSM (Carl Zeiss). În starea endogenă oxidată a fibrei s-a obținut o rată înaltă a semnalului care a condus la o imagine de contrast înalt a ratei (**A**, a se compara nivelurile de fluorescență respective din *Figura 1*). Adăugarea a 1 mM de octanoilcarnitină şi a 5 mM malat a produs o scădere în intensitatea imaginii ratei datorată stingerii fluorescenței flavoproteinice şi creşterii fluorescenței NAD(P)H-ului (**B**, a se compara nivelele semnalelor de fluorescență din *Figura 1*). Distribuția uniformă a schimbărilor de fluorescență este o dovadă a accesibilității complete a întregii populații mitocondriale pentru substraturi în ambele fibre. Adăugarea a 1 mM de ADP a produs din nou o imagine de contrast înalt a ratei(**C**, a se compara nivelurile respective de fluorescență din *Figura 1*). Avem, din nou, o accesibilitate uniformă a tuturor mitocondriilor

Scanned with OKEN Scanner

pentru substanțele externe adăugate în cele 2 fibre. Limitările de difuzie descrise pentru adeninnucleotide în fibrele permeabilizate provin în mod evident,deci, nu din probleme ale difuziei în rețeaua de fibre, ci sunt strâns corelate cu membrana mitocondrială externă [332, 339, 343]. Adăugarea în final a 4 mM de cianură de potasiu şi a 10 mM de glutamat în grupul de fibre a avut ca rezultat o stingere completă a fluorescenței flavopoteinelor şi un maximum de fluorescență a NAD(P)H-ului, cauzând o imagine întunecată a ratei (**D**, a se compara nivelele respective de fluorescență din *Figura 1*). Prin urmare, imaginea ratei fluorescenței flavoproteinelor şi NAD(P)H-ului permite obținerea unei cartografieri a funcției mitocondriale la nivelul unei singure fibre musculare şi poate fi folosită pentru investigarea unei posibile eterogenități funcționale. În sinteză, datele obținute furnizează o dovadă fermă pentru integritatea funcțională şi accesibilitatea pentru substrate externe a întregii populații mitocondriale din fibrele musculare permeabilizate cu saponină.

Pentru a estima reacția metabolică a mitocondriilor, am extras histograme de valoare gri (*gray value histograms*) din imaginile confocale prezentate în *Figura 2*, în diferite stări metabolice ale fibrelor.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste histogramearată cantitativ că o mai înaltă intensitatea fluorescenței este asociată cu regiunea subsarcolemală, în timp ce intensitatea fluorescenței regiunii intermiofibrilare este mai joasă.

Interesant este că schimbările intensității fluorescenței flavoproteinelor ca reacție de răspuns la substraturi sunt mai ample în regiunea subsarcolemală decât în regiunea intermiofibrilară. Prin contrast, stingerea fluorescenței DASPMI la adăugarea deconectorului TTFB este uniformă în ambele fibre. În concluzie, am detectat în acelaşi timp o stingere a fluorescenței DASPMI,atât în zona subsarcolemală, cât şi în cea intermiofibrilară, în timp ce stingerea fluorescenței flavoproteinice se petrece predominant în regiunea subsarcolemală.

Cea din urmă este indicată printr-o scădere cu aproximativ 50% a semnalului flavoproteinic din vârful histogramei corespunzând zonei subsarcolemale. Dat fiind că *DASPMI*-ul se acumulează în mod egal în toate mitocondriile, se poate observa din histogramele fluorescenței flavoproteinelor corespunzătoare că acest conținut al dehidrogenazei α-lipoamidice a flavoproteinei fluorescente dependente de *NAD* este de circa patru ori mai mare în *SSM* decât în *IMM*. Aceste rezultate susțin ferm ideea că *IMM* şi *SSM* au proprietăți biochimice diferite.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele de mai sus sugerează eterogenitatea mitocondrială în fibrele musculare simple. Pentru a examina în continuare această posibilitate, am realizat experimente de colorare cu un alt marcator mitocondrial fluorescent verificat – MitoTracker™ Green FM – care colorează mitocondriile, indiferent de starea lor funcțională (229, Hoth *et al.*, 1997).Experimentele s-au efectuat după cum urmează.

Primul pas a fost obținerea unei imagini a fluorescenței flavoproteinice la o excitație de 100% (laser cu ioni de argon, 488 nm)şi apoi stingerea semnalului prin adăugarea substraturilor de glutamat şi malat. Ulterior am incubat fibrele timp de 40 de minute cu 250 nM de MitoTracker™ Green FM şi am obținut imaginea unei fluorescențe MitoTracker™ Green FM cu 30% energie de excitație. În starea oxidată a fibrelor s-au observat zone subsarcolemale cu semnale înalt de fluorescență flavoproteinică. Aceste zone, precum şi zonele IMM adiacente sunt colorate cu MitoTracker™ Green FM, prezentând o distribuție subcelulară caracteristică a mitocondriilor în miofibre. Totuşi, au fost prezente unele diferențe frapante între semnalul MitoTracker™ Green FM şi cel flavoproteinic. În primul rând, s-au identificat zone subsarcolemale pozitive la flavoproteine, ceea ce indică o suprapunere

Scanned with OKEN Scanner

substanțială cu semnalul MitoTracker™ Green FM. În al doilea rând, s-au observat zone subsarcolemale negative la flavoproteine, ceea ce arată un semnal MitoTracker™ Green FM foarte clar definit. În final, am mai identificat zone subsarcolemale care prezintă o fluorescență de rezervă, atât din semnalul MitoTracker™ Green FM, cât şi din cel flavoproteinic. Ultimele zone corespund pozițiilor subcelulare caracteristice mionucleilor, întrerupând rețeaua subsarcolemală a mitocondriilor ce se acumulează.

Aceste descoperiri oferă dovezi directe pentru populații de mitocondrii definite pe zone, caracterizate prin proprietăți diferite ale fluorescenței flavoproteinice. Datele sunt în concordanță cu prezența subpopulațiilor mitocondriale *pozitive la DASPMI/ negative la fluorescența flavoproteinică* şi *pozitive la DASPMI/ pozitive la fluorescența flavoproteinică* din histogramele prezentate în *Figura 2*.

Detectarea eterogenității mitocondriale în fibrele musculare unice prin metode imagistice [207] i-a îndemnat să examineze suspensii de mitocondrii din mușchi scheletic izolat de şoarece, prin citometrie în flux. Au folosit o abordare similară, cum am prezentat mai sus, pentru detectarea autofluorescenței mitocondriale citometrice in flux [204]. Au fost izolate

Scanned with OKEN Scanner

mitocondrii din muşchi scheletic de şoarece prin tratarea cu tripsină a țesutului muscular, omogenizare şi apoi centrifugare diferențiată. S-a obținut un amestec de SSM şi IMM. S-a examinat fluorescența flavoproteinică /DASPMI conform cu protocolul descris mai sus. A fost analizată fluorescența mitocondriilor individuale cu proprietăți similare de difuzie a luminii

În starea liberă de substrat, flavoproteinele fluorescente din aceste mitocondrii sunt preponderent oxidate(puternic fluorescente). Totuşi, în aceste condiții s-a observat o distribuție destul de eterogenă a intensităților fluorescenței mitocondriilor individuale. Adăugarea de substrate mitocondriale de glutamat + malat a indus o deviere medie a apexului spre intensități de fluorescență mai scăzute şi a mărit uşor histograma. Pentru a exclude impuritățile preparatuluica o posibilă cauză a asimetriei observate, în aceeaşi suspensie s-a adăugat colorant fluorescent DASPMI. Adăugarea de DASPMI a deviat fluorescența a aproape tuturor particulelor din zona analizată, indicând că asimetria se produce mai degrabă din cauza eterogenității mitocondriale şi nu a impurităților din preparat. Adăugarea deconectorului TTFB a dus la o eliberare completă a DASPMI-ului din mitocondrii [207]. Ca urmare, reapare o distribuție

Scanned with OKEN Scanner

a fluorescenței de o eterogenitate considerabilă, foarte asemănătoare cu histograma de autofluorescență în stare oxidată. Prin urmare, pot fi excluse artefactele nespecifice colorante, potențial independente de membrana mitocondrială.

De aici, eterogenitatea aparentă a distribuției fluorescenței flavoproteiniceîn mitocondriile intacte provenite din mușchi scheletici de șoarece poate fi atribuită prezenței diferitelor subpopulații mitocondriale.

Așadar, fibra musculară este o celulă multinucleată înalt diferențiată, care pune în evidență o organizare spațială caracteristică pentru mitocondrii. Mitocondriile musculare sunt organizate în compartimente subsarcolemale și intermiofibrilare. Multe observații sugerează că ar putea exista o relație între topologia mitocondrială subcelulară și funcțiile mitocondriale diferențiale [77, 293, 302, 379]. Analiza topologică a acestei relații nu este încă posibilă din cauza lipsei unor metode care să ofere măsurători simultane ale compartimentării metabolice și structurale. În această lucrare am putut vizualiza activitatea fosforilării oxidative mitocondriale la diferite niveluri, în fibre musculare unice, nefixate.

Pentru a cuantifica schimbările respiratorii de autofluorescență în lanț ale flavoproteinelor și a NAD(P)H-ului, care sunt marcatori biologici

Scanned with OKEN Scanner

intrinseci ai sistemului NAD-redox mitocondrial, am folosit microscopia confocală de scanare cu laser şi microscopia imagistică digitală a fluorescenței țesutului muscular [361]

Fibrele permeabilizate cu saponină, din muşchi *cvadriceps* de şoarece au fost folosite pentru investigarea acestor autofluorescențe la nivelul unei singure celule. Această metodă de preparare este bine documentată în studii ultrastructurale anterioare, care au pus în evidență o morfologie completă bună şi păstrarea mitocondriilor în compartimentele lor subcelulare [9, 229, 402].

Prin urmare, tehnica ne permite să abordăm eterogenitatea funcțională şi spațială a metabolismului energetic din fibrele de muşchi scheletic, prin modificări experimentale ale mediului extramitocondrial. În special, mitocondriile subsarcolemale (SSM) şi mitocondriile intermiofibrilare (IMM), care ar putea fi implicate diferențial în procesele neurofiziologice şi patologice, pot fi analizate simultan [77, 293, 302, 379].

Lucrările noastre anterioare au confirmat că semnalele de fluorescență, detectate la o excitație de 366 nm îşi au originea în NADH-ul mitocondrial, în timp ce semnalele de fluorescență înregistrate la o excitație laser cu ioni de argon 488 nm se datorează în mare parte emisiei unei

Scanned with OKEN Scanner

jumătăți oxidate cu flavină din cuantumul dehidrogenazei mitocondriale flavoproteinice α-lipoamidice [200]. Arătăm în această lucrare că fluorescența flavoproteinică obținută în stare de oxidare a miofibrei se suprapune în mare măsură cu fluorescența colorantului potențiometric mitocondrial DASPMI [30, 154] şi, de asemenea, cu aceea a MitoTracker™ Green FM [155], care este un marcator constitutiv al mitocondriilor. Imaginile fluorescenței obținute prin microscopie confocală arată *pattern*-ul de organizare mitocondrială de sub sarcoleme (SSM) şi de-a lungul miofibrilelor (IMM). În ciuda similarităților în distribuțiile autofluorescenței şi semnalului DASPMI în miofibreleunice, între aceste *pattern*-uri s-au constatat, de asemenea,diferențe evidente. Acestea s-au observat deosebit de pregnant prin cuantificarea fluorescenței în histograme, indicând în mod clar o reducere substanțială a nivelului semnalului flavoproteinic din zona intermiofibrilară (IMM) a fibrei, în comparație cu compartimentul SSM. Prin contrast, DASPMI-ul arată o intensitate mai omogenă a semnalului de fluorescență, asociată atât cu SSM, cât şi cu IMM. Acest fapt sugerează prezența de mitocondrii cu diferențe în compoziția flavoproteinică. Cuantificarea dată indică un conținut de patru ori mai mare de dehidrogenază α-lipoamidică a

Scanned with OKEN Scanner

flavoproteinelor fluorescente în SSM decât în IMM. Studiile de colocalizare cu marcatori mitocondriali MitoTracker™ Green FM au validat aceste rezultate. În plus, s-a văzut că în zona subsarcolemală se constată o eterogenitate substanțială a semnalului de fluorescență flavoproteinică. S-A găsit un indiciu clar în ceea ce privește existența a două subansambluri mitocondriale topologice. Un subansamblu este negativ pentru fluorescența flavoproteinică (mitocondrii negative la fluorescență flavoproteinică / pozitive la fluorescență MitoTracker™ Green FM), iar celălalt e pozitiv pentru fluorescența flavoproteinică (mitocondrii pozitive la fluorescență flavoproteinică / negative la fluorescență MitoTracker™ Green FM). Pentru a testa această observație, s-a aplicat citometria în flux pe mitocondrii izolate din mușchi unic de șoarece. Mitocondriile de mărimi similare au arătat o distribuție eterogenă non-Gaussianăa semnalelor de autofluorescență cauzate de flavoproteine, în timp ce întreaga populație indică o acumulare destul de uniformă a colorantului fluorescent DASPMI.

Ținând cont de faptul că acumularea de DASPMI în spațiul matriceal mitocondrial este cunoscută ca dependentă de prezența unui înalt potențial membranar al membranei mitocondriale

Scanned with OKEN Scanner

interne [199], toate particulele colorate sunt, prin urmare, mitocondrii intacte funcțional. Mai mult, acumularea de DASPMI poate fi complet inversată prin deconectorul TTFB, un protonofor ce cauzează disiparea potențialului membranar. Aceste rezultate susțin în continuare prezența în fibrele de muşchi scheletic a unor subpopulații mitocondriale, care conțin diferite cantități de flavoproteine fluorescente.

S-a sugerat mai sus că mitocondriile cu diferite localizări subcelulare în miofibre ar putea avea compoziții proteinice diferite [200, 207, 208,] lucru care s-ar putea datora diferențelor în importul de proteine mitocondriale [211].Datele acestui studiu susțin această posibilitate. Mai mult decât atât, s-a dovedit că eterogenitatea mitocondriilor este mai înaltă decât se aştepta, prin simpla distincție a tipului subsarcolemal şi intermiofibrilar. Conținutul mai ridicat de flavoproteine fluorescente al uneia dintre populațiile SSM, identificat în prezenta investigație, poate explica diferențele prezentate, dintre SSM şi IMM privind capacitatea oxidativă pentru substratele generatoare de NADH şi FADH [302]. Au fost detectate aceste diferențe biochimice ale subpopulațiilor mitocondriale în condiții-model, dinamice, *in situ*. Prin urmare, apariția artefactelor datorate procedurilor de izolare,

Scanned with OKEN Scanner

capabile să fi condus la rezultate contradictorii, poate fi exclusă [248].

Un pas important în procedura analitică a funcțiilor (sau disfuncțiilor) mitocondriale *in situ* este elaborarea unor metode care să ofere înțelegerea dinamicii redox intrinseci a membranei mitocondriale interne. S-a arătat în această lucrare că schimbări destul de mici ale stărilor NAD-redox pot fi evaluate prin reprezentarea imagistică a raportului flavoproteine fluorescente / NAD(P)H. La adăugarea de substrate mitocondriale, de ADP sau de inhibitori ai fosforilării oxidative, s-au observat schimbări inverse ale intensităților fluorescențelor flavoproteinelor şi NAD(P)H-ului. Acest lucru are ca rezultat schimbări importante în reprezentările imagistice ale acestui raport.În fibrele simple, aceste schimbări sunt destul de uniforme, ceea ce vine în conformitate cu o accesibilitate completă a întregii populații mitocondriale. Prin urmare, în ciuda diferențelor detectate în fluorescențele flavoproteinice ale diferitelor subansambluri mitocondriale, comportamentul funcțional global al acestora în preparatele de fibre permeabilizate cu saponină este unic. Rezultatele noastre au implicații directe în analiza funcțiilor celulare ale mitocondriilor. În primul rând, prin corelarea spațială directă a marcatorilor mitocondriali intrinseci *redox* cu

Scanned with OKEN Scanner

coloranți potențiometrici în acumulare şi/sau marcatori mitocondriali constitutivi, e posibilă disocierea căii de fosforilare oxidativă în diferite compartimente. În al doilea rând, prin aplicarea de diverse substrate mitocondriale sau de inhibitori specifici, este posibilă declanşarea sistemului şi inducerea experimentală a unor schimbări în *situs*-urile subcelulare din aceste compartimente distincte. Prin urmare, compartimentarea funcțiilor mitocondriale poate fi studiată într-un mod dinamic.

În al treilea rând, prin abordarea prezentată aici, reprezentările imagistice funcționale ale mitocondriilor din miofibre unice pot clarifica consecințele funcționale şi distribuționale ale heteroplasmiei ADN-ului mitocondrial, ce apare în citopatiile mitocondriale. În aceste condiții patologice, subpopulațiile mitocondriale genotipic diferite, care ar putea avea proprietăți biochimice diferite, vor putea fi detectate într-un fascicul de fibre şi chiar într-o fibră unică.

2.3. CARDIOMIOCITELE PERMEABILIZATE DUPĂ EXTRAGEREA MIOZINEI-FANTOMĂ

Una dintre observațiile pe care le-am obținut este că, atunci când extragem miozina din

Scanned with OKEN Scanner

cardiomiocitele izolate (30 de minute cu 800 mK KCL), acestea îşi păstrează structura. Acest fapt poate fi observat în *Figura 3*, ce prezintă imagini microscopice în fluorescență şi imunofluorescență ale acestor cardiomiocite-fantomă, în care mitocondria este aşezată în şiruri aproape paralele, ca în celulele intacte.

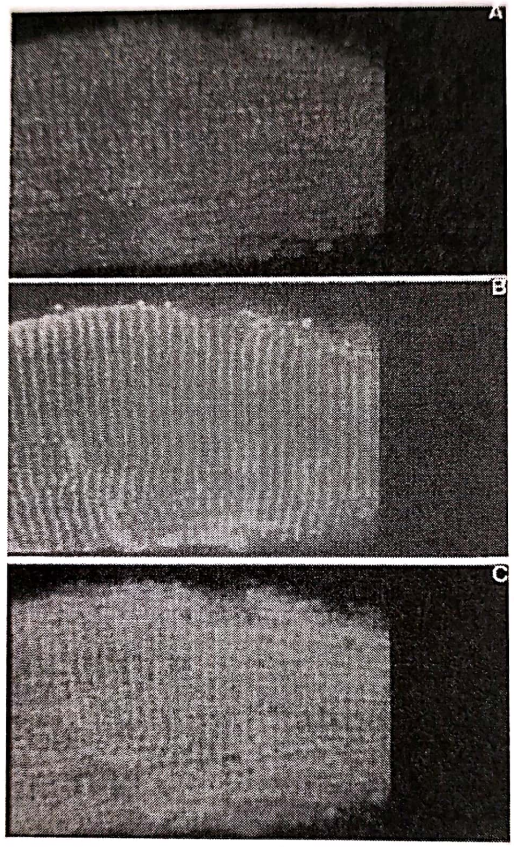


Fig. 3. **Dubla marcare imunofluorescentă detectată la microscop confocal a cardiomiocitelor-fantomă. (A) Marcarea mitocondriei cu nonylorange (vezi 'Materiale şi metode'). Se observă coloanele de mitocondrii (culoarea verde) şi schema striată a poziției lor. Benzile reprezintă 4pm (B) marcarea desminului în cardiomiocitele-fantomă. Celulele-fantomă sunt incubate cu antiser anti-desmină (diluție 100), apoi incubate cu anticorpi secundari rhodamin-conjugați F(ab')2. Culoarea roşu aprins**

Scanned with OKEN Scanner

corespunde anticorpilor anti-desmină. Benzile reprezintă 4 μm (C) superpoziția fluorescenței nonylorange legate de mitocondrie (verde) şi fluorescența anticorpilor anti-desmin marcați cu rodamină (roşu). Se vede că mitocondria este întotdeauna între liniile Z printre care marcajul cu desmină este clar vizibil.

Poziția lor evidențiază, de altfel, în mod foarte interesant, un oarecare tipar al striațiilor, iar când imaginile de fluorescență ale mitocondriei şi desminei sunt suprapuse, striațiile sunt identificate la nivelul lamei **Z**, datorită desminei (*Figura 3* C). Într-adevăr, anticorpii antidesminei marchează citoscheletonul, mai ales, la nivelul lamei 2 (*Figura 3* B). Citoscheletonul reprezintă o structură, mai degrabă stabilă, a celulelor, supraviețuind nu doar permeabilizării, ci şi tratamentului agresiv cu soluții puternic ionizate. *Figura 3* relevă, de asemenea, că sistemul citoscheletal fixează mitocondria în poziții exacte în celulele *in vivo*. Studiile noastre anterioare, cu ajutorul microscopului electronic, dovedesc o bună păstrare, în aceste condiții, atât a membranei exterioare, cât şi a membranei interioare. [170]. Imaginile pentru celulele-fantomă obținute la microscopul electronic, se pot vedea în *Figura 4*.

Scanned with OKEN Scanner

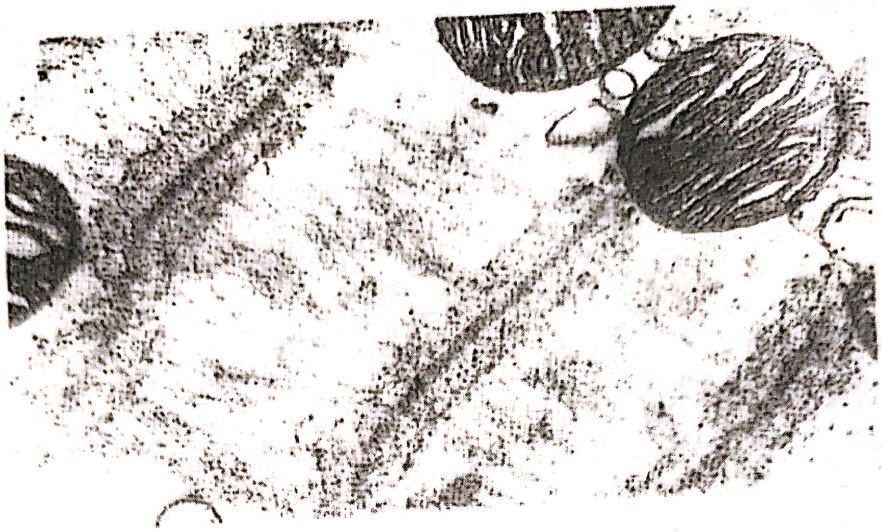


Fig. 4. **Imagine de microscopie electronică de transmisie cu celule cardiace în fibre-fantomă. Magnetizare 54000x.**

Se observă starea perfectă a membranelor exterioare şi a celor interioare. În aceste celule, activitatea respiratorie mitocondrială este complet intactă [351] şi caracterizată de un Km aparent foarte înalt [351]. Astfel, atât structura mitocondrială cât şi funcţia sunt intacte în aceste fibre; mai mult decât atât, poziţia mitocondrială în celule se păstrează datorită interacţiunii cu elementele citoscheletale. Rezultatul vine în întâmpinarea multor studii anterioare [9, 61, 80, 104, 192, 202, 229, 291, 329, 332, 338, 339, 344, 343, 351, 401, 402, 404, 409, 430] şi în opoziţie totală cu propunerea grupului Kushmerick asupra vezicularizării, în aceste condiţii, a mitocondriei în particule submitocondriale [430].

Dacă anticorpii antidesminei marchează toate liniile **Z** în aceste cardiomiocite, din care s-a

Scanned with OKEN Scanner

extras miozina, n-ar trebui să fie probleme de difuzie chiar şi pentru moleculele mari de imunoglobină. Iar, odată ce activităţile respiraţiei mitocondriale, aceste celule-fantomă au fost găsite ca fiind identice cu cele din fibrele şi celulele permeabilizate, înaintea extragerii miozinei [402]; se poate, aşadar, considera că acesta este cel mai simplu şi mai potrivit model experimental pentru studiul structurilor mitocondriale *in vivo*.

2.4. CARACTERISTICILE RESPIRAŢIEI MITOCONDRIALE ÎN CELULELE PERMEABILIZATE

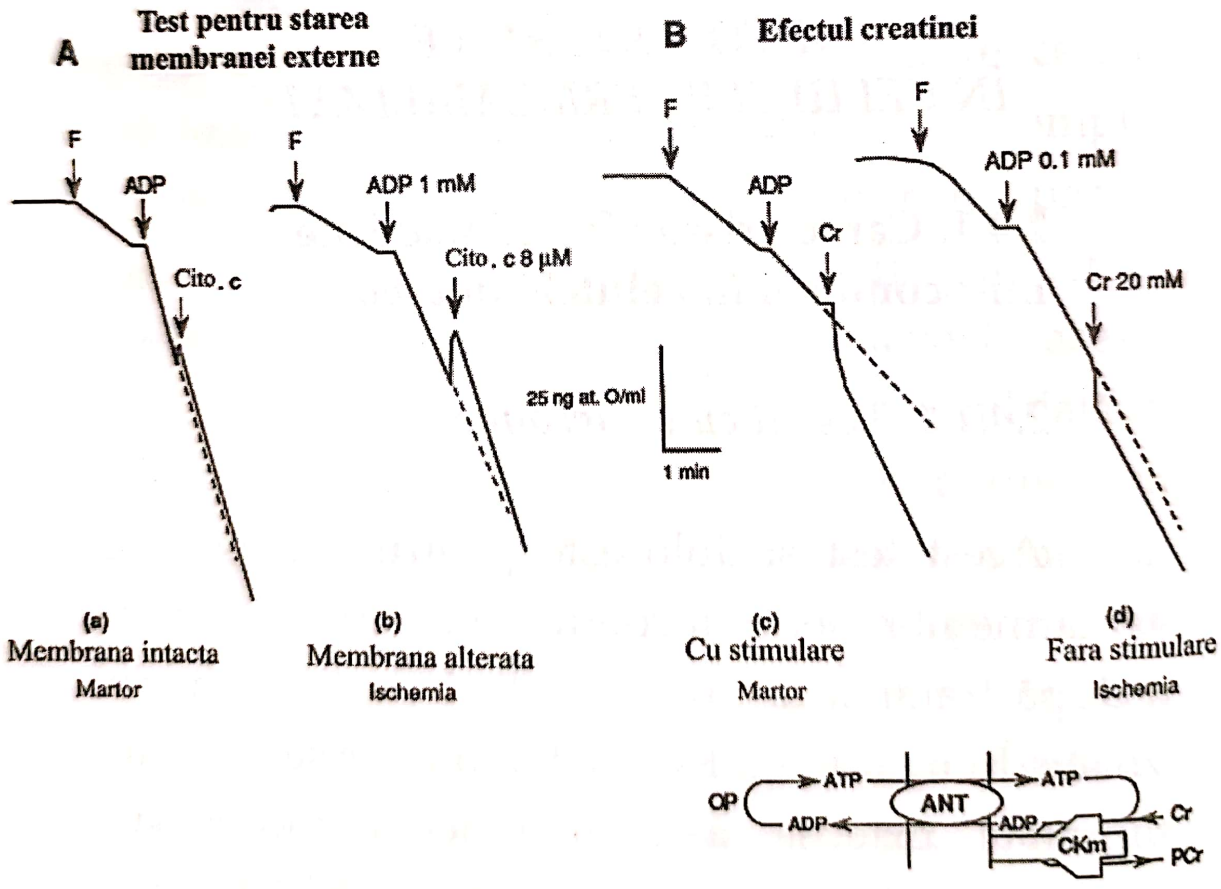
2.4.1. Caracteristici funcţionale ale mitocondriei în celulele *in vivo*

2.4.1.1. Testul cu citocrom c

Acest test se foloseşte pentru a determina starea membranei mitocondriale exterioare înainte şi după tratarea ţesutului, inclusiv a mitocondriei izolate. În mediul cu KCL, citocromul **c** se rupe din suprafaţa externă a membranei mitocondriale interne şi, dacă membrana mitocondrială este afectată, părăseşte spaţiul mitocondrial intermembranos, descrescând, astfel, ritmul respiraţiei [351]. Totuşi, prin adăugarea de

Scanned with OKEN Scanner

citocrom c exogen, respirația se reface, în aceste condiții, complet. Ilustrarea folosirii acestei metode se face în *Figura 5 A*, care arată înregistrările respirației fibrei cardiace pregătită din inima intactă şi, apoi, din inima perfuzată, după 1 oră de ischemie normotermică. De vreme ce KCl, în concentrație mare, sustrage creatinchinaza de pe suprafața membranei mitocondriale interioare, nu este recomandată folosirea acestei soluții pentru studierea efectelor creatinei asupra respirației.



Scanned with OKEN Scanner

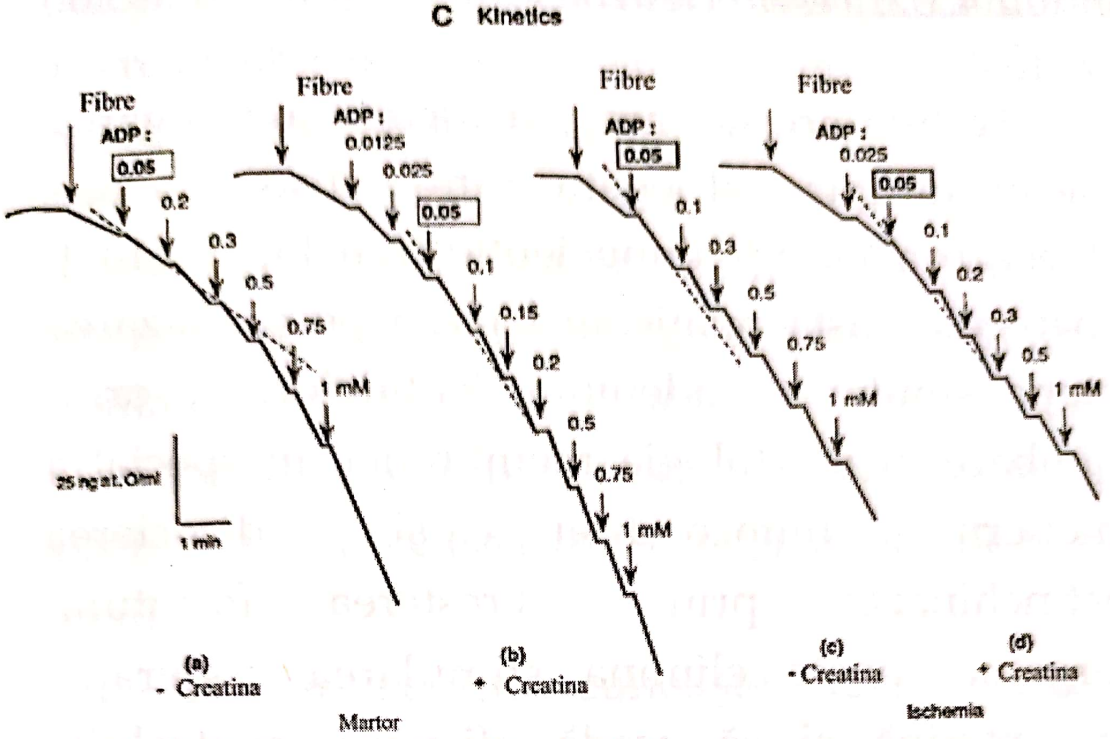


Fig. 5. (A) Înregistrare a testului citocrom c pentru membrana mitocondrială externă intactă. A fost adăugat ADP pe fibre la concentrația finală de 1mM pentru o activare maximală a respirației, apoi citocromul c a fost adăugat la o concentrație finală de 8 μM. Schimbările în concentrația de oxigen au fost înregistrate cu oxigraful. Martor – fibre izolate din inima *in situ;* ischemia – inima înaintea izolării fibrelor a fost ținută pentru 1h sub ischemie normotermică totală. (B) Înregistrând testul creatinei pentru starea funcțională a reacției cuplate creatinchinazice mitocondriale în fibrele permeabilizate. ADP a fost adăugat în concentrație de 0,1 mM, apoi creatina în concentrație de 20 mM. (C) Înregistarea cineticii reglării respiratorii de către ADP în fibrele permeabilizate ale inimii. Concentrația creatinei a fost 20 mM. Pentru martor şi ischemie vezi 5A.

Scanned with OKEN Scanner

2.4.1.2. *Testul creatinei*

Testul acesta are ca scop investigarea caracterului intact al legăturii între creatinchinaza mitocondrială şi adeninnucleotid-translocaza [187]. Deoarece această relație se bazează pe canalizarea metabolismului adeninnucleotidelor, orice schimbare în morfologia membranei, în special a tumefierii mitocondriei şi disocierea creatinchinazei, prin creşterea fosfatului anorganic, poate elimina stimularea respirației prin creatină şi să scadă eficiența controlului respirației prin reacția creatinchinazei. *Figura 5B* oferă exemplificări referitoare la acest test. În fibrele din inima intactă, adăugarea de creatină, în prezența unei concentrații submaximale a *ADP*-ului (0,1 μM), activează respirația prin stimularea conținutului de ADP şi fosfocreatină din ATP-ul mitocondrial. În fibrele din inima ischemică, creatinchinaza se separă de membrană, iar stimularea prin creatină nu se efectuează, se pierde. Acesta este unul dintre cei mai sensibili indicatori ai afectării ischemice a inimii.

În ciuda numărului mare de investigații dedicate studiului proprietăților şi funcțiilor izoenzimei mitocondriale, creatinchinaza existența sa nu este foarte des luată în calcul în studiile fiziologice şi metabolice ale muşchiului cardiac. De

Scanned with OKEN Scanner

obicei, un simplu concept al unei reacții echilibrate a creatinchinazei este folosit pentru calcularea concentrației citoplasmatice a *ADP*-ului şi a parametrilor derivați. Acest concept, simplificat, consideră citoplasma ca un spațiu cu o distribuție mai mult sau mai puțin omogenă a metaboliților cu greutate moleculară scăzută şi numai adeninnucleotidele intra-/extra-mitocondriale sunt socotite ca rezerve (*stocuri separate*) demne de luat în calcul.

Oricum, pentru a cunoaşte adevărul, trebuie să ținem cont de existența, din abundență, a creatinchinazei mitocondriale în celulele inimii. Enzima mitocondrială este codată de o genă separată [272] şi este poziționată între citoplasmă şi sistemul de fosforilare oxidativă de pe suprafața externă a membranei interne. *Locul cheie* a creatinchinazei mitocondriale, modifică inevitabil relațiile dintre rezervele fosfat înalt-energetice din mitocondrii şi componentele citoplasmatice.

2.4.2. Cinetica reglării respirației *ADP*-ului

În mitocondriile izolate, ratele fosforilării oxidative şi ale absorbției oxigenului pot fi controlate direct de *ADP* şi, indirect, de sistemele producătoare de *ADP*, cum ar fi creatinchinaza

Scanned with OKEN Scanner

mitocondrială. În prezența creatinei și a *ATP*-ului, această enzimă produce *ADP* și fosfocretină, direct proporțional cu concentrația creatinei [434].

În cardiomiocite, mitocondriile sunt localizate printre miofibrile, în întreg volumul celulei. Ratele respiratorii sunt determinate de concentrația locală a *ADP*-ului, ori a creatinei care este disponibilă pentru adeninnucleotid-translocaza sau, respectiv, pentru creatinchinaza mitocondrială. În consecință, mitocondriile cardiomiocitare pot fi considerate ca *dovezi enzimatice* pentru concentrația locală ale acestor substraturi. Din acest motiv au fost determinate răspunsurile mitocondriilor izolate sau *in situ* la schimbările concentrațiilor *ADP*-ului sau creatinei (la 0, 2 *μMATP*) în mediul de incubație. Dacă difuzia este limitată, valorile *Km*-ului pentru aceste substraturi pot creşte, semnificativ, în cardiomiocite [94].

Am observat diferențe izbitoare în cinetica *stimulării* respirației de către *ADP*, între mitocondriile izolate şi cardiomiocitele izolate. În mitocondriile izolate, etapa a 3-*a* a respirației s-a amplificat foarte rapid atunci când, în domeniul micromolar, şi concentrația *ADP*-ului, şi valoarea *Km*-ului aparent observatau crescut; *ADP*-ul era de 17, 65 ± 1, 0 μM. Adăugarea saponinei nu a schimbat cinetica activării respirației de către *ADP*

Scanned with OKEN Scanner

în mitocondriile izolate, ceea ce concordă cu datele obținute de Altschuld şi colaboratorii [1]. Oricum, în cardiomiocitele izolate şi saponin-lizate, fosforilarea oxidativă mitocondrială a fost activată de *ADP*, doar atunci când concentrația în mediu a crescut cu câteva sute de micromoli. Pentru maxima activare a respirației, în cardiomiocitele tratate cu saponină, a fost necesar circa 1 *μMADP*. Valoarea *Km*-ului aparent, observatpentru *ADP* în aceste cardiomiocite, a fost de 250 ± 30,5 *μM*. Deoarece sarcolema a fost complet distrusă de saponină, cel mai mare *Km* aparent observat pentru *ADP* – de mai mult de o unitate magnitudine – pare a fi în corelație cu restricția difuziei sale în cardiomiocite.

Analizând cinetica reglării respirației de către creatină la 0,12 *μMATP*, n-am observat diferențe în ceea ce priveşte *Km*-ul pentru acest substrat, între mitocondriile izolate şi cardiomiocitele tratate cu saponină (*Km* 6 – 6, 9 *μM*. Aşadar, nu există nici o restricție în difuzia creatinei în cardiomiocite, ceea ce demonstrează faptul că limitarea difuziei este în foarte strânsă legătură cu *ADP*.

Activarea creatinchinazei mitocondriale modifică semnificativ reglarea respirației de către *ADP*. În prezența a 25 *μM* de creatină, dependența de concentrația *ADP*-ului a ratelor respirației în

Scanned with OKEN Scanner

cardiomiocitele saponin-lizate a fost, din nou, mai mare şi apropiată de cea din mitocondriile izolate (*Km*-ul aparent observat (*ADP*) 36,5 ± 5,6 μM. În prezența creatinei, fosforilarea oxidativă menține crescută producția de adeninnucleotide, datorită cuplului funcțional dintre creatinchinază şi adeninnucleotid-translocază [434, 435]. În experimentele noastre acest cuplu funcțional este văzut ca un amplificator al efectului *ADP* asupra respirației; *Km*-ul aparent observat pentru *ADP*-ul externa descrescut cu mai mult de 90%, datorită unei producții crescute de adeninnucleotide în mitocondrii. În prezența creatinei (*metabolismul*) difuzia limitată a *ADP*-ului a fost suficientă pentru a menține rate înalte ale respirației,ca şi rate înalte ale producției fosfocreatinice. Rezultatele demonstrează clar posibilul rol al creatinchinazei în reglarea *in vivo* a fosforilării oxidative mitocondriale.

Datorită proprietăților specifice ale mitocondriei *in vivo*, pot fi obținute informații foarte importante privind cinetica reglării respirației prin ADP, în absența şi prezența creatinei, cum se ilustrează în *Figura* 5C. Această figură indică o metodă rapidă de determinare a afinității fosforilării oxidative mitocondrale pentru ADP. Totuşi, în cazurile cele mai importante, este de dorit să se analizeze ritmul inițial al respirației stimulate de ADP în diferite concentrații [329],

Scanned with OKEN Scanner

pentru a evita neregularitățile observării periodice a respirației. Această investigație oferă informații simultane despre starea membranei externe mitocondriale şi legătura dintre adeninnucleotid-translocaze şi creatinchinaze în mitocondrie .

2.4.3. Activitățile segmentelor lanțului respirator sau sinteza ATP-ului

Folosirea substraturilor specifice şi a inhibitorilor permite determinarea cu uşurință a activității diferitelor segmente ale lanțului respirator mitocondrial în fibre [202, 201]. De asemenea, este interesant de văzut cum se poate face o determinare precisă a activității sintezei ATP-ului *in vivo* [291].

2.4.4. Proprietățile mitocondriei în celulele in vivo care se pierd în timpul izolării

2.4.4.1. Specificul țesutului în reglarea respirației prin ADP

Mitocondria izolată *in vitro*, independent de țesuturile folosite pentru preparare, este considerată ca având o mare afinitate pentru ADP, din simplul motiv că membranele mitocondriale exterioare

Scanned with OKEN Scanner

sunt permeabile față de moleculele cu masă uşoară, mai mică de 10 KD. Valoarea determinată experimental a Km-ului aparent pentru ADP este de 10-20 μM cu mitocondria izolată [331].

Cu toate acestea, un fenomen necunoscut anterior s-a semnalat în fibrele unde mitocondria este localizată în structuri celulare cvasiintacte. Este evident că afinitatea mitocondriei pentru ADP depinde de specificul țesutului – în țesuturile oxidante – ca inimă, muşchiul *soleus*; Km-ul aparent pentru ADP în reglarea fosforilării oxidative este surprinzător de mare, depăşindu-l pe cel al mitocondriei *in vitro*, cu mai multe ordine de mărime [61, 291, 338, 339, 343, 404, 409, 430].

Pentru fibrele din inimă sau muşchiul scheletic *soleus* valoarea Km-ului aparent pentru ADP este între 300-500μM. Aceste valori sunt valabile şi pentru cardiomiocitele-fantomă. Pentru muşchii scheletici, pentru gastrocnemius alb, roşu şi mixt (Gw, Gr, Gm respectiv) valorile sunt între 10-15μM, la fel cu cele pentru mitocondria izolată (vezi capit. următor).

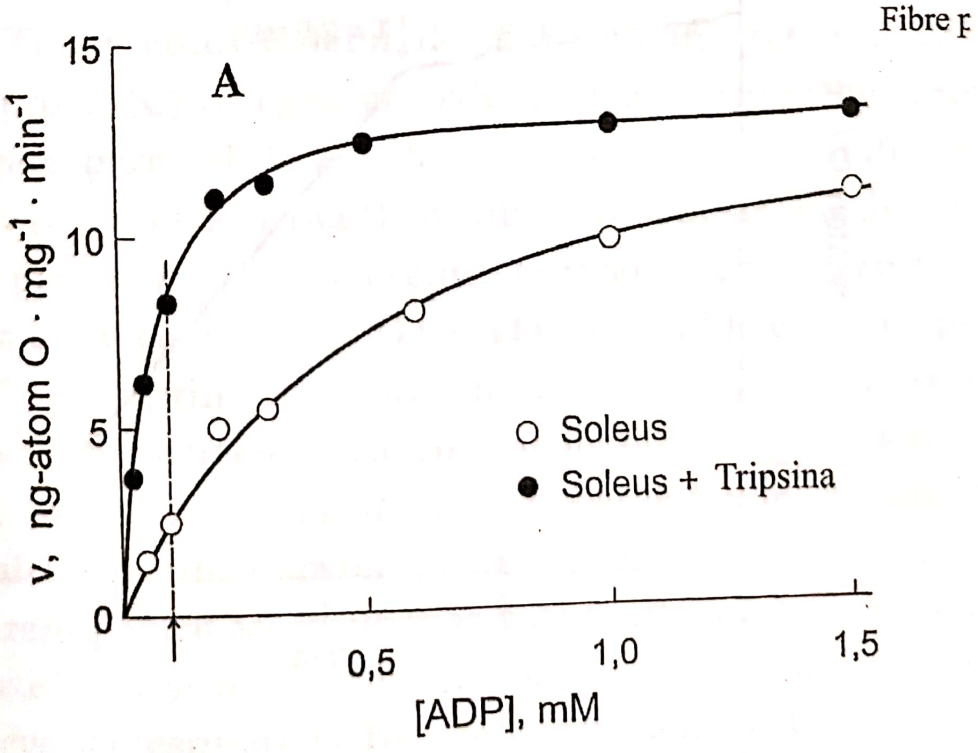
2.4.4.2. Specificul „controlului respirator" prin enzimele proteolitice

Un alt fenomen interesant şi nou totodată, s-a observat în fibrele cu afinitate mitocondrială

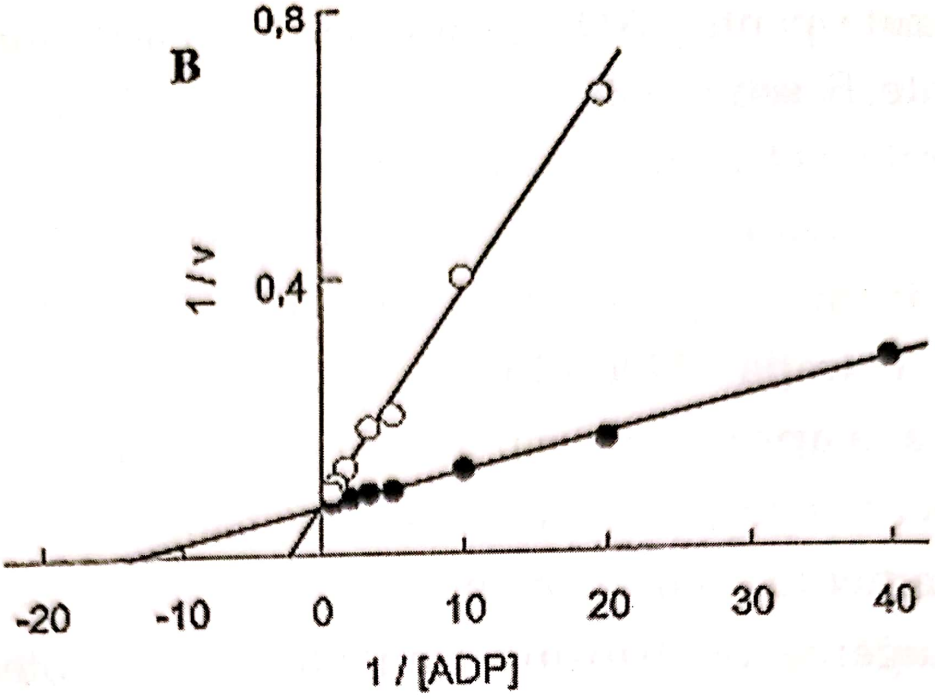
Scanned with OKEN Scanner

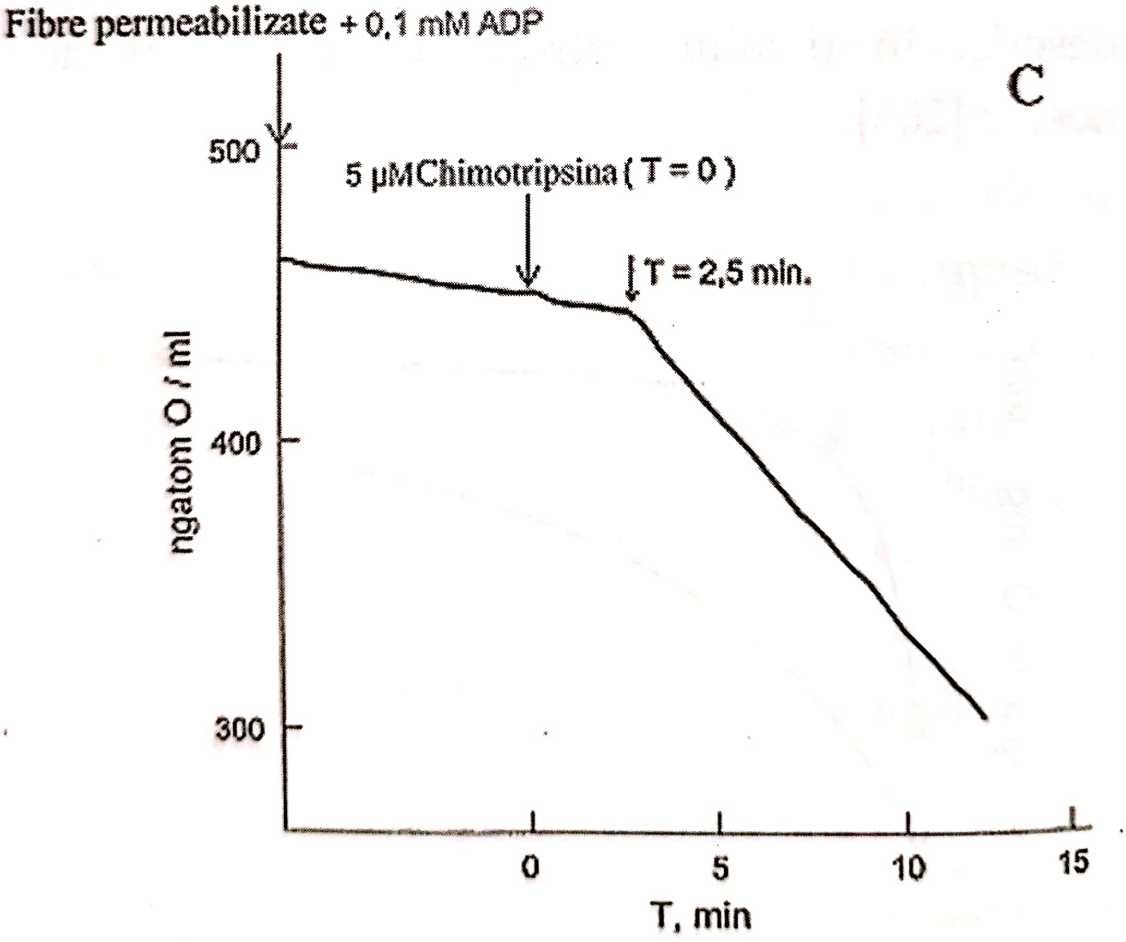
scăzută pentru ADP şi anume că această afinitate poate fi schimbată printr-un tratament de scurtă durată,cu tripsină, al fibrei (*Figura* 6).

Figura 6A ilustrează că acest tratament modifică dependența ritmului respirator de concentrația ADP-ului, scăzând Km-ul aparent până la aproximativ 40 µM (*Figura 6B*). Dacă fixăm concentrația ADP-ului la nivelul submaximal, fără tratamentul cu tripsină, să spunem 0,1 µM, adăugarea de tripsină (sau alt agent proteolitic) creşte rapid ritmul respirației datorită schimbărilor în dinamica reglării respirației *ADP*-ului. Acest fapt duce la fenomenul de „control respirator" cu tripsină, înfățişat în *Figura 6C*. Fenomenul este descris, în detaliu, într-un articol recent de-al nostru [208].



Scanned with OKEN Scanner





Scanned with OKEN Scanner

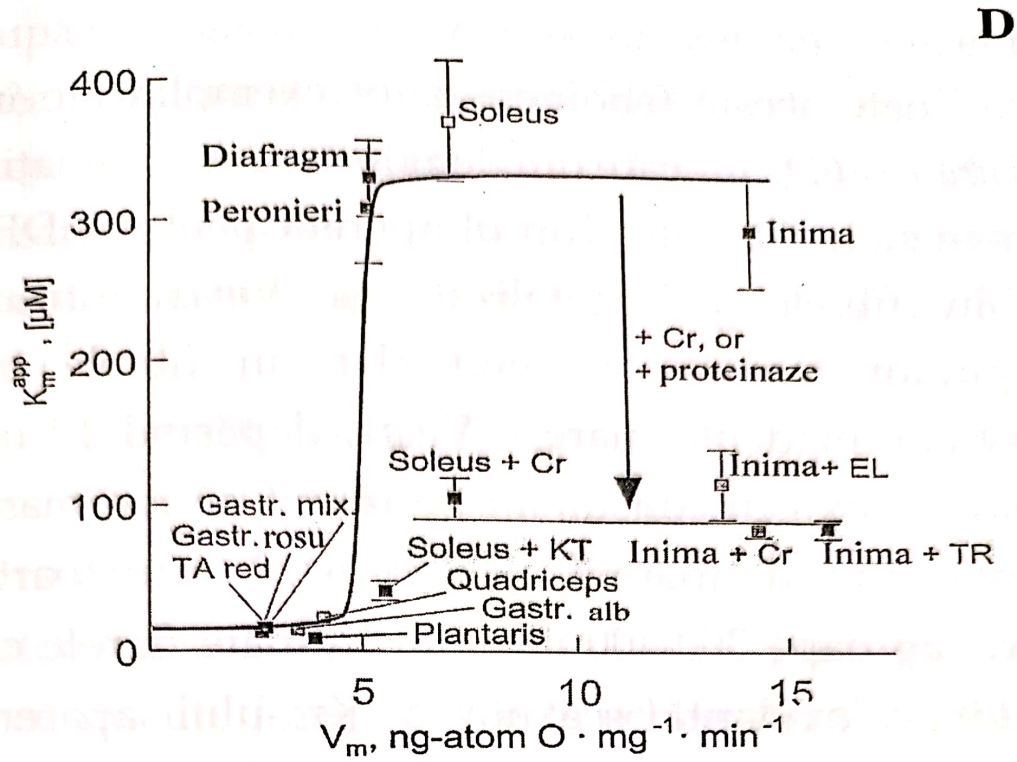


Fig. 6. **Efectul tratării cu tripsină a fibrelor permeabilizate din muşchiul *soleus* de la şobolan asupra cineticii reglării respiratorii de către ADP. Tripsina a fost utilizată în concentraţie de 125μg/ml timp de 15 min. (A) Schimbările în frecvenţa respiraţiei ca o funcţie a concentraţiei de ADP. (B) Tratamentul datelor de la Fig7A în graficele dublu-reciproce. (C) Înregistrări oxigrafice ale respiraţiei fibrelor soleare permeabilizate la 0,1 mM ADP: Afinităţile sunt mici (aparent Km înalt) în inimă, m. solear, m. diafragm, m. peronieri – şi crescute (aparent Km scăzut) prin tratament cu tripsină (TR), elastază (EL), chemotripsină (KT) sau prin adăugare de creatină. În toate fibrele muşchilor scheletici cu contracţie rapidă (*gastrocnemius* alb, mixt, roşu, *cvadriceps*, *tibialanterior* şi *plantar*) afinitatea mitocondriei pentru ADP, arătată de Km-ul aparent pentru acest substrat, este foarte mare (aparent Km foarte mic) şi insensibilă la adiţia tripsinei sau creatinei. Frecvenţa respiraţiei a fost determinată la 21⁰ C.**

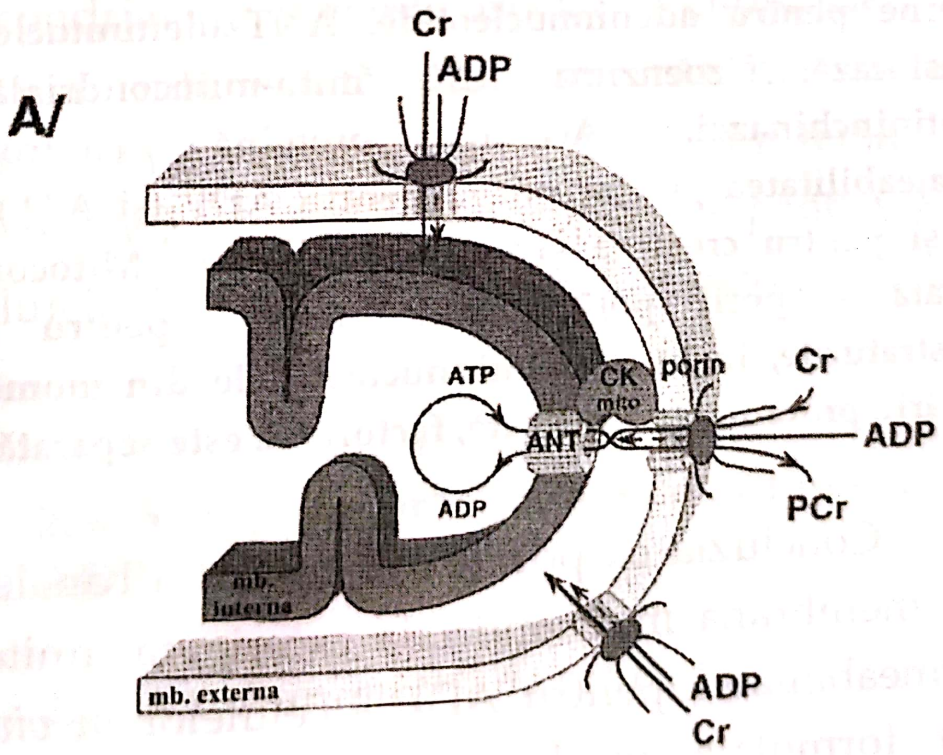
Scanned with OKEN Scanner

Toate aceste fenomene sunt exemplificate în *Figura 6D*, care demonstrează relația fenomenologică între Km-ul aparent pentru ADP-ul în fibrele permeabilizate şi V*max*, ritmul respirator maxim. În mod clar, în fibrele cu activitate oxidantă mare – V*max*, depăşind 10 ng atomi de oxigen consumați pe minut pe mg masă uscată, Km-ul aparent pentru ADP este foarte mare, aproape 300-400 µM, iar, în toate fibrele cu activitate oxidantă scăzută a Km-ului aparent pentru ADP-ul *in vivo*, nu este diferit de cel *in vitro*, amândouă fiind între 10-20 *µM*. În cardiomiocite şi *soleus*, afinitatea mitoconriei pentru ADP poate fi ridicată – Km-ul aparent pentru ADP descreşte semnificativ prin ruperea membranei mitocondriale exterioare, printr-o procedură de tumefiere [351, 332]. Iar, cum această afinitate este, de asemenea, crescută de câteva ori prin tratamentul fibrelor cu tripsină (vezi *Figura 6D*), valoarea ridicată a Km-ului aparent pentru ADP este evident dependentă de o anume proteină citoplasmatică, extramitocondrială, care controlează permeabilitatea porilor din membrana mitocondrială exterioară (VDAC) pentru ADP-ul în celulele cu țesuturi cu activitate oxiativă mare [351, 329, 339, 343, 332, 401, 353]. Într-adevăr, când ADP-ul este produs în spațiul intermembranos,

Scanned with OKEN Scanner

după o reacție a creatinchinazei în prezența creatinei, afinitatea pentru *ADP* este din nou crescută şi, în acelaşi timp, *Km*-ul pentru *ADP* descreşte (*Figura 6D*), datorită creşterii adeninnucleotidelor în reacțiile cuplate [329, 351, 353].

Această probabilă explicație a multitudinii de date experimentale privind controlul permeabilității porilor porinilor în membrana mitocondrială exterioară *in vivo*, prin proteine necunoscute [339, 343], este schematic ilustrată în *Figurile* 7A şi B.



Scanned with OKEN Scanner

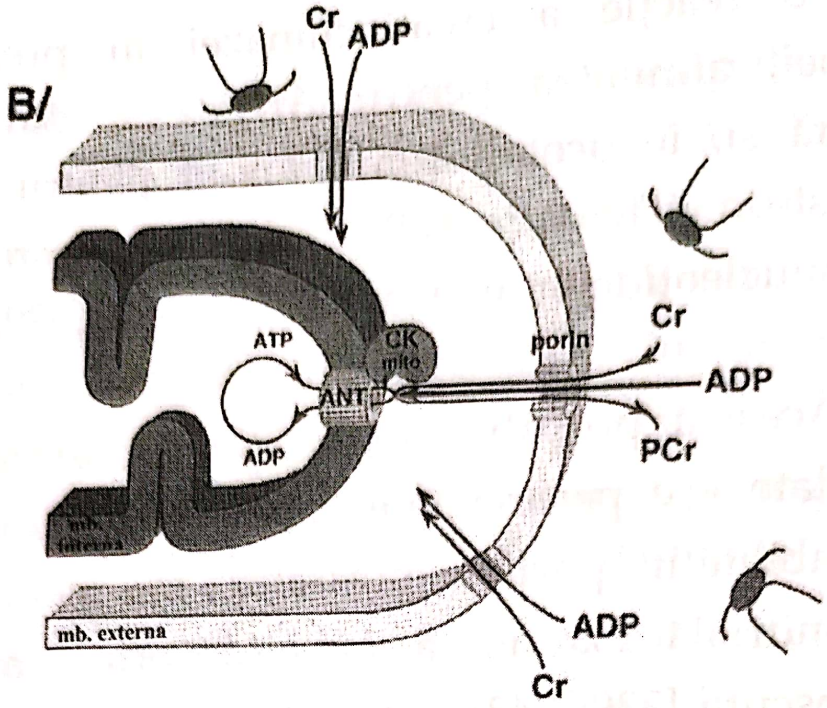


Fig. 7. **(A) Conexiunea ipotetică dintre mitocondrie şi proteina citoplasmatică probabil asociată citoscheletului, controlând permeabilitatea membranei mitocondriale externe pentru adeninnucleotide. ANT-adeninnucleotid-translocază, izoenzima CK mito-mitocondrială a creatininchinazei. Această proteină controlează permeabilitatea porilor porini pentru ADP (şi ATP), dar nu şi pentru creatină şi fosfocreatină. (B) Mitocondria izolată – porii porini sunt deschişi pentru toate substraturile, inclusiv adeninnucleotidele din momentul izolării, proteina necunoscută, factorul x, este separată.**

Concluzia că porii porinici – sau canalele – din membrana mitocondrială exterioară limitează permeabilitatea pentru ADP a celulelor *in vivo*, a fost formulată pe baza rezultatului tumefierii hipoosmotice, care a determinat ruptura acestei membrane, precum şi o scădere drastică a Km-ului aparent pentru ADP [339, 343, 351]. Valabilitatea

Scanned with OKEN Scanner

acestei concluzii a fost confirmată în laboratorul lui Rigoulet, care a demonstrat că, în timp ce celulele permeabilizate "wild-type" arată un Km aparent pentru ADP-ul foarte mare în reglarea respirației, cu o valoare de 30 de ori mai mare pentru mitocondria izolată, în celulele mutante cu deficiență de pori porinici nu există nici o diferență între aceşti parametri ai mitocondriei *in vivo* şi *in vitro*. Deoarece cardiomiocitele-fantomă, care conțin numai mitocondria şi citoscheletonul, arată aceeaşi valoare înaltă a Km-ului pentru ADP, la fel ca toate celulele permeabilizate, s-a concluzionat că factorul proteinic care controlează proprietățile mitocondriale *in vivo* este asociat cu citoscheletonul. Cea mai interesantă problemă rămâne de aici înainte să vedem care este proteina ce concentrează afinitatea mitocondrială pentru ADP în celulele din țesuturi, cu activitate oxidantă mare.

2. 4. 5. Aspecte practice ale determinării ADP-ului respirator

2. 4. 5. 1. Parametrii de control

O dificultate tipică în evaluarea parametrilor controlului respirator prin ADP, rezultă din necesitatea de a decide dacă mostra studiată

Scanned with OKEN Scanner

conține o populație uniformă de mitocondrii sau un amestec de două populații cu valori diferite ale Km-ului. Situația din urmă poate apărea, în primul rând, din cauza tratării improprii a mostrei (de exemplu – alterarea mecanică a fibrelor), dar se poate datora şi eterogenității mostrei. Această situație va fi analizată, pragmatic, mai jos, pentru a evita eventualele erori de interpretare a datelor. Cel mai convenabil este să determinăm valorile Km-ului şi V*max*, prin aplicarea directă a datelor pe relația hiperbolică:

$$V = V_{Total} - V_o = \frac{V_{max}[ADP]}{Km + [ADP]} \quad (1)$$

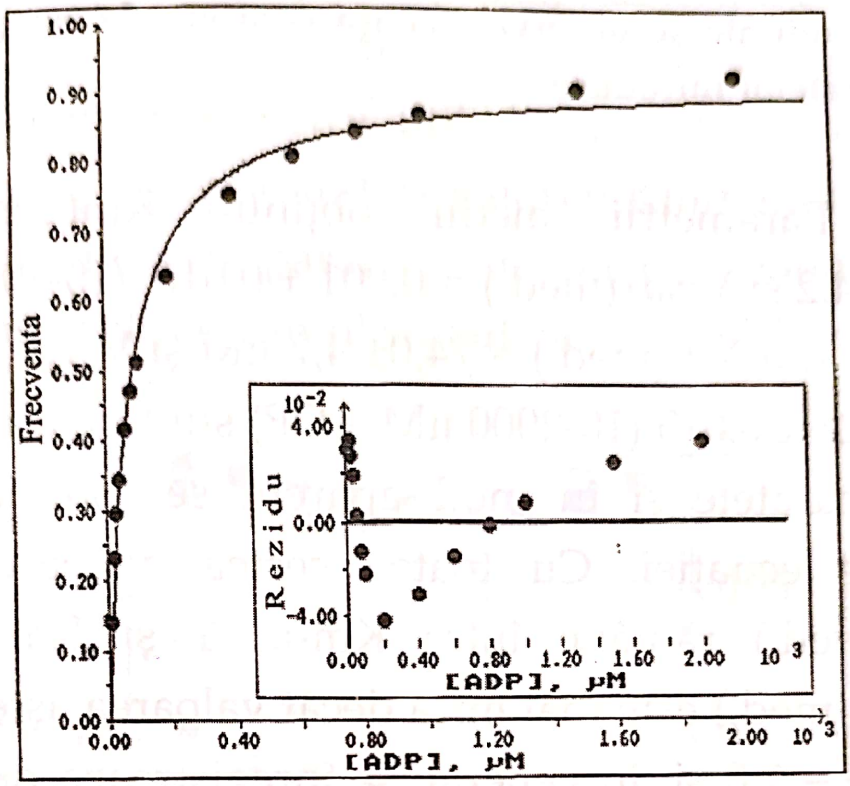
Când mostra conține două populații, avem:

$$V = \frac{V_{max}\,1\,[ADP]}{Km\,1 + [ADP]} + \frac{V_{max}2\,[ADP]}{Km\,2 + [ADP]} \quad (2)$$

Din păcate, suprapunerea celor două hiperbole cu valori ale *Km*-ului diferite este surprinzător de plană, chiar la valori diferite ale Km-ului. *Figura 8*A arată că deviațiile de date, calculate conform ecuației *(2)*, pentru un număr egal de două populații mitocondriale cu valori ale Km-ului de 300 μM şi 30 μM, comparate cu

Scanned with OKEN Scanner

rezultatele ecuației *(1)* nu diferă, decât cu câteva procente, (4%) pentru valoarea V*max*.



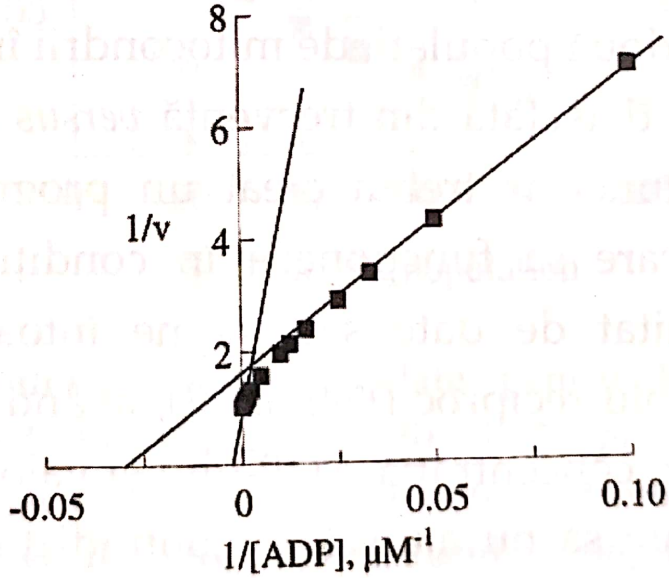


Fig. 8. **(A) Dependențele calculate (modelate) ale frecvențelor respirației la concentrații de ADP între 10-1000 μM conform ecuației (2) pentru Kml =300 μM, Vml=0,5; Km2=30 μM, Vm2=0,5 μM şi recalculate conform**

Scanned with OKEN Scanner

ecuației(*1*). Graficul mic inserat arată devierea datelor de la hiperbolaunică (*single*)calculată. (B) Graficul dublu-reciproc al datelor din Fig. 7A. Două populații mitocondriale se observă clar,așa cum era de așteptat în baza datelor introduse.

Parametrii „medii" obținuți, Km(med.) = 68,9±4,2 şi V*max*(med.) = 0,901 ± 0,016 (10-1000µM ADP) sau Km(med.) = 74,0± 4,7 µM şi V*max*(med.) = 0,926 ± 0,015 (10-2000 µM ADP) sunt determinați cu acuratețe şi în mod aparent se asociază cu datele ecuației. Cu toate acestea, valoarea lui Km(med.) rămâne între Km-ul 1 şi Km-ul 2, V*max*(med.) este mai mică decât valoarea aşteptată V*max* = 1,0 şi, în general, se înregistrează deviații ale rezultatelor față de linia dreaptă. Astfel, prezența a două populații de mitocondrii în mostră nu poate fi detectată din frecvență *versus* acțiunea **ADP** şi, atunci ar trebui creat un program mai sofisticat, care să funcționeze în condițiile unui număr limitat de date sau să ne întoarcem la graficul dublu-reciproc (*Figura 8B*), având grijă ca, în acest caz, concentrația *ADP*-ului şi valorile Km-ului estimate să nu ajungă în contradicție. Există însă cazuri când diferențele Km-ului aparent, pentru variatele populații de mitocondrii, sunt suficient de mari ca să poată fi detectate, chiar în frecvență *versus* acțiune **ADP**.

Scanned with OKEN Scanner

2.4.5.2. *Km-ul mediu*

Fără îndoială, Km(med.) determinat din datele experimentale medii folosind ecuația **(1)** poate fi un parametru util din punct de vedere practic. *Figura 9* ne indică valorile Km(med.) ca şi V*max*(med.) comparativ cu fracția populației mitocondriale cu Km-ul scăzut, descrisă în *Figura 9*.

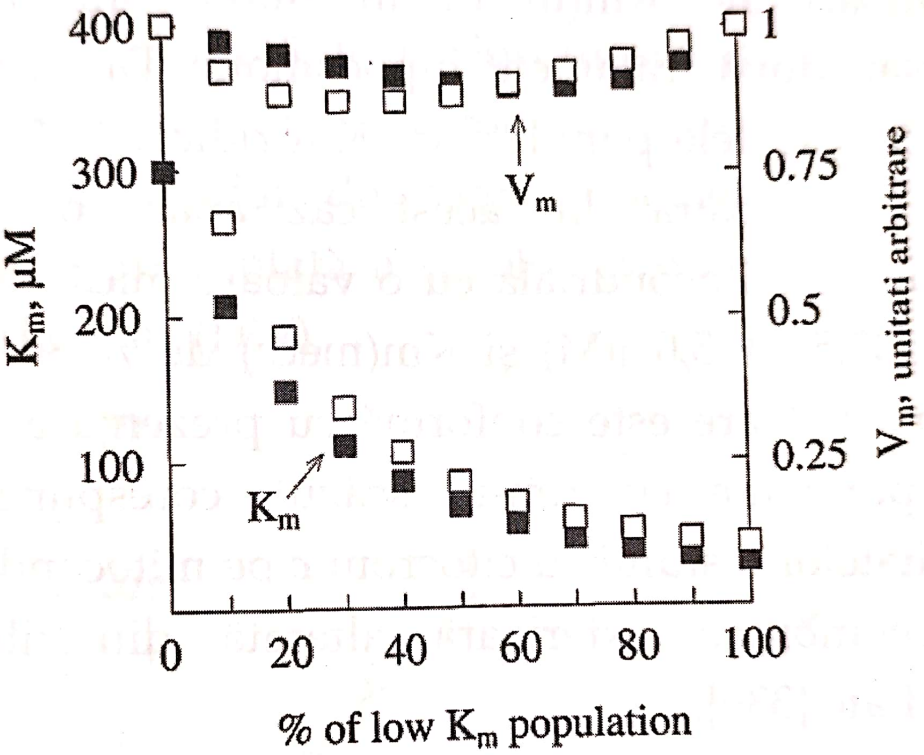


Fig. 9. **Valorile medii calculate pentru Km(med.) şi Vm(med.) dinhiperbola *single* din Fig.7 reprezentate grafic în raport cu fracția populației mitocondriilor cu Km de valoare joasă din mostră. Pentru ambele populații V*max* a fost considerat egal cu unitatea. Simbolurile albe – Km scăzut = 40 µM; simbolurile negre – Km scăzut = 30 µM.**

Din *Figura 9* apare ca evident faptul că prezența a cel puțin 10% din mitocondriile cu Km

Scanned with OKEN Scanner

scăzut produce o diminuare pronunțată a Km(med.), de exemplu la 210 μM pentru Km1 = 300 μM şi Km 2 = 30 μM. Astfel, Km(med.) este un parametru sensibil la calitatea mostrei de fibră şi poate fi folosit pentru a calcula raportul populației mitocondriale ce produce valori extreme ale Km-ului.

Situația din *Figura 9,* de exemplu, prezintă schimbări ale Km(med.) în fibrele inimii de şobolan după tratament hipoosmotic. Dincolo de binecunoscutele populații cu Km ridicat (315 ± 48 μM), în mostra din acest caz apare o nouă populație mitocondrială cu o valoare mică a Km-ului (32,5 ± 5,0 μM) şi Km(med.) de 70-80 μM. Ultima valoare este conformă cu prezența a 42% din populație cu Km-ul scăzut, corespunzând rezultatelor testului cu citocrom *c* pe mitocondriile cu membrana exterioară alterată din fibrele tumefiate [339].

Poate fi reținut, de asemenea, faptul că alegerea nepotrivită a nivelului concentrațiilor ADP-ului (nivel prea scăzut sau absența informațiilor factuale la concentrații scăzute de ADP) poate conduce la concluzii derutante, când a doua populație mitocondrială nu este detectabilă.

Scanned with OKEN Scanner

2.4.5.3. *Determinarea Vmaximal*

Determinarea valorii V*max* (DW) - masă uscată se face prin corelarea V*max* obținut cu valorile determinate ale masei uscate. Această soluție este folositoare în special pentru determinarea V*max* (*DW*), pentru muşchii cu contracție rapidă, care conțin un număr redus de mitocondrii respiratorii. *Figura 10* ilustrează că o încercare intuitivă de a folosi mostre de fibră mari (mai mult de 6-7mg masă uscată), pentru a creşte rata consumului de oxigen, poate produce o deviație pronunțată a datelor şi o subestimare a valorii V*max* (DW).

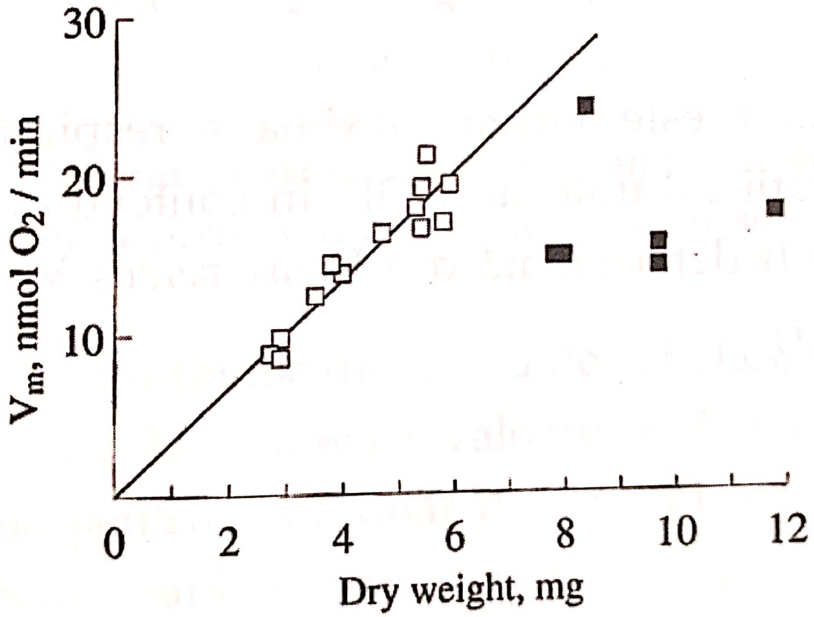


Fig. 10. **Determinarea frecvenței maxime a respirației fibrelor permeabilizate din muşchiul *gastrocnemius* alb de şobolan. Este periculoasă utilizarea unor fibre prea mari din cauza problemelor de linearitate ce pot fi în relație cu reagregarea fibrelor din celulele oxigrafice.**

Scanned with OKEN Scanner

2.4.5.4. *Indicele acceptor de control (ACI) – controlul calității*

Se pot folosi *două tipuri* de indici de control al respirației.

❋ *a) Primul*, cel mai obișnuit, este acceptorul de control prin ADP, numit *index de control respirator*, RCI-ul, definit inițial ca fiind raportul vitezelor respiratorii în Starea 3 şi Starea 4. Datorită activității susținute a MgATP-azei din fibre, RCI-ul este considerat drept corespunzător raportului:

$$(V_o + Vmax)/V_0 = 1 + Vmax/V_0,$$

unde V*max* este viteza maximă a respirației la concentrații saturate de ADP. În contextul actual, ar putea fi determinată din V*max versus* V_o grafic (*Figura 11*).

Scanned with OKEN Scanner

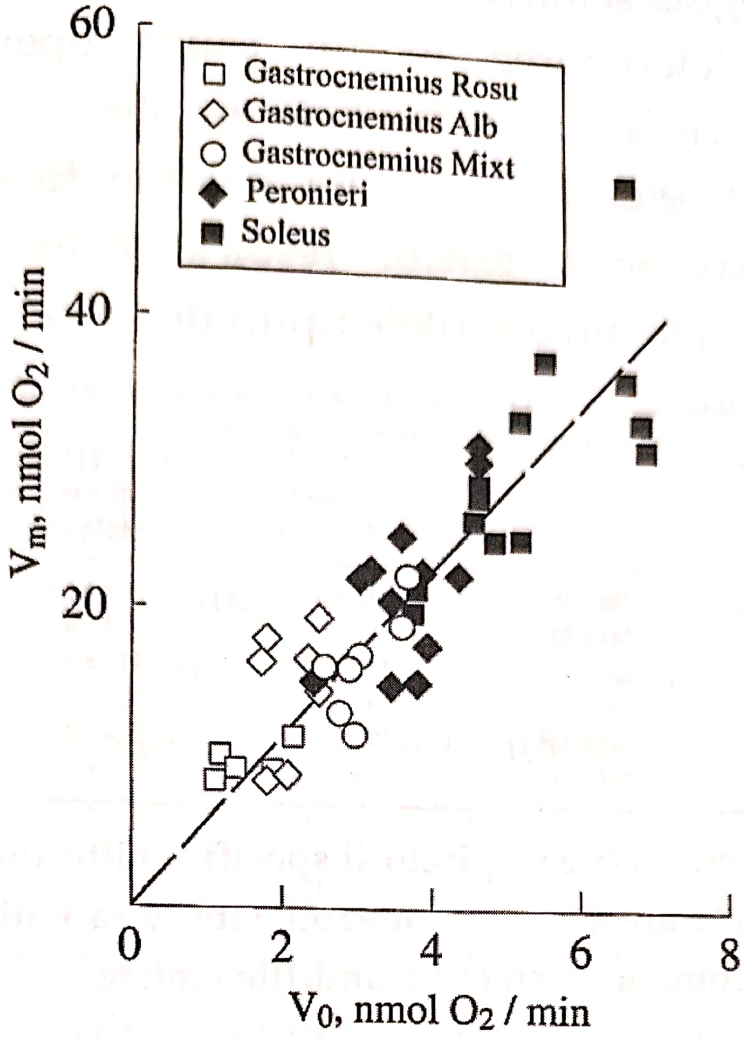


Fig. 11. **Determinarea indicelui de control al respirației pentru fibrele permeabilizate prelevate de la şobolani.**

Pentru fibrele din inimă de şobolan, RCI-ul = 6,4 (*Figura 11*). Aceeaşi valoare a RCI pare a fi valabilă pentru un număr de muşchi scheletici de contracție rapidă sau lentă, independent de valorile Vm (DW)-ului lor. Generalitatea acestei concluzii ar putea fi subiect de discuție; cu toate acestea, în opinia noastră orice deviație de la această valoare pentru muşchiul nestudiat anterior merită o atenție specială. Valoarea redusă a RCI-

Scanned with OKEN Scanner

ului de regulă semnalează pregătirea inadecvată a fibrelor, deteriorarea lor,din cauza operațiilor adiționale sau a conservării îndelungate.

În *Tabelul 1* sunt date valorile tipice ale vitezei maxime a ratelor respirației în fibrele permeabilizate din diferitele tipuri de muşchi.

Specii	Tipul de muschi	Mitocondrii izolate, V_{max}, nmol O_2/ min/nmol aa_3	Fibre permeabilizate V_{max}, nmol O_2/ min/mg dwt	citocrom aa_3, nmol/g wwt	V_{max}, nmol O_2/ min/nmol aa_3
om	vastus lateralis	298 ± 55	8.6 ± 1.9	5.6 ± 1.8	260 ± 57
soarece	quadriceps	343 ± 62*	11.3 ± 3 5	5.6 ± 0.4	341 ± 105
soarece	inima	n.d.	33.9 ± 0.7	44 ± 9	131 ± 26
sobolan	inima	190	20 - 25	22.5 ± 2	152 - 187
sobolan	soleus	247 ± 32*	18.2 ± 0.7	12.4 ± 0.5	224 ± 10
sobolan	quadriceps	247 ± 32*	7 9 ± 0.7	5.2 ± 0.6	230 ± 8

Tabelul 1. **Activitățile respiratorii specifice mitocondriilor din fibrele musculare permeabilizate cu saponină, comparate cu mitocondriile izolate.**

* Mitocondriile au fost izolate din muşchiul scheletic integral. Toate activitățile respiratorii au fost determinate în prezența a 10mM glutamat, 5mM malat şi 1 mM ADP. Raportul masă umedă/masă uscată de 6,2±0,3 (25 determinări) a fost utilizat pentru calcularea vitezelor specifice.

❋ ***b).*** *Al doilea* indice util este acceptorul de control exercitat de creatină datorat reacției de conjugare a creatinchinazei în mitocondrii (C_rI – vezi mai sus), sub următorul raport:

Scanned with OKEN Scanner

$$C_rI = (V_{cr} - V_{o,1\ ADP}) / V_{o,1ADP}$$

Aceasta este activarea relativă a respirației prin 20 *μM* concentrație de creatină în prezența a 0,1 *mM ADP*. În fibrele cardiace intacte este de 0,6 – 0,65.

Finalitatea întreprinderii noastre analitice este să urmărim mecanismul de reglare a respirației mitocondriale *in vivo*, în mușchi diferiți, la șobolan și șoarece normal și la șoarece transgenic cu deficiență în desmină. Tehnica fibrei permeabilizate a fost utilizată pentru a studia respirația mitocondrială în celulele cardiace *in vivo*, în *soleus* și în mușchii *gastrocnemius* albi ai acestor animale. De asemenea, cardiomiocitele au fost izolate din inimă de șobolan normal, permeabilizate cu saponină, iar cardiomiocitele-*fantomă* au fost produse prin extragerea de miozină cu 800 *μM KCl*. Utilizarea microscopului confocal imunofluorescent și a anticorpilor antidesmină a arătat buna conservare a mitocondriei și a sistemului citoscheletic în aceste celule-*fantomă*. Cinetica reglării respirației prin ADP, a fost, de asemenea, studiată, în detaliu, în aceste celule, înainte și după legarea anticorpilor anti-desmină cu filamente intermediare. În fibrele cardiace permeabilizate sau în cele ale mușchiului *soleus*, dar nu și în fibrele mușchilor scheletici de

Scanned with OKEN Scanner

contracție rapidă, cinetica reglării respirației mitocondriale prin *ADP* a fost caracterizată de valori foarte mari ale *Km*-ului aparent (afinitate joasă) egale cu 300-400 *μM*, depășind această valoare pentru mitocondria izolată prin factor de 25.

În fibrele permeabilizate ale mușchiului *soleus*, inhibarea parțială a respirației prin NaN_3 nu a produs scăderea semnificativă a*Km*-ului aparent pentru *ADP*, aceasta excluzând posibila explicație de afinitate aparentă redusă a mitocondriei la *ADP* în aceste celule, prin rapida lui degradare (datorată activității de oxidare intensă) și prin probleme de difuzie intracelulară. Totuși, tratarea de scurtă durată cu tripsină a fibrelor a scăzut această valoare constantă la 40-70 *μM*, confirmând aserțiunea anterioară că sensibilitatea mitocondriei la ADP *in vivo* este controlată de o anume proteină citoplasmatică. Cardiomiocitele-*fantomă* ce conțin preponderent mitocondrii și citoscheleton și își păstrează forma normală, au manifestat,de asemenea, valori mari ale *Km*-ului aparent pentru *ADP*. Prin urmare, acestea sunt probabil cea mai indicată structură pentru studierea factorilor celulari care controlează funcția mitocondrială în celulele *in vivo*. În aceste celule-*fantomă*, anticorpii anti-desmină nu au modificat cinetica reglării respirației prin *ADP*. Totuși, în fibrele

Scanned with OKEN Scanner

permeabilizate ale inimii şi ale muşchiului *soleus* de la şoareci transgenici cu deficienţă de desmină, au fost observate anumite schimbări în cinetica reglării respiraţiei prin *ADP*: în aceste fibre au fost observate *două populaţii* de mitocondrii, *una* cu un *Km* aparent de obicei înalt pentru *ADP* şi*cealaltă*cu un *Km* aparent foarte jos pentru *ADP*. Observaţiile morfologice prin microscopie electronică au confirmat existenţa a două populaţii de celule distincte în miocitele şoarecilor cu deficienţă în desmină. Rezultatele au permis concluzia că motivul pentru *Km*-ul aparent înalt la ADP, observat, în reglarea fosforilării oxidative din inima şi celulele musculare scheletice de contracţie lentă *in vivo*îl constituie permeabilitatea redusă a porilor-porini din membrana mitocondrială exterioară, şi nu problemele de difuzie a *ADP*-ului în însuşi interiorul celulelor. Cel mai probabil, în aceste celule există o proteină asociată cu citoscheletonul, care controlează permeabilitatea porilorporini mitocondriali externi (*VDAC*) pentru *ADP*. Numai desmina singură nu exercită acest tip de control asupra porilor porini mitocondriali, dar, în absenţa acesteia, apar celule cu o structură dezorganizată şi o populaţie mitocondrială alterată, lipsită, probabil, de această proteină necunoscută care controlează *VDAC*. Astfel, ar putea exista o conexiune funcţională între

Scanned with OKEN Scanner

mitocondrii, organizarea structurală a celulei şi citoscheleton la celulele *in vivo*, datorată existenței unui factor proteinic (unor factori proteinici), încă neidentificat (neidentificați).

*

* *

Detaliind problemele, vom începe prin a afirma că numeroase studii ultrastructurale au evidențiat existența a multiple conexiuni între elementele citoscheletonului şi mitocondrii în diferite tipuri de celule [8, 30, 60, 68, 151, 214, 222, 229, 231, 236, 370, 299, 419]. Aceste conexiuni au fost demonstrate foarte clar de grupul Penman, prin utilizarea microscopiei electronice [299, 419]. Studiile anterioare efectuate la microscopul electronic au revelat existența unei legături strânse între filamentele intermediare şi mitocondrii în diferite tipuri de celule [8, 30, 68, 222, 236, 370,]. Pentru celulele cardiace, diverse grupuri de autori au arătat că adesea filamentele de desmină pot fi observate în strânsă legătură cu mitocondriile. [236, 370]. Pe de altă parte, studii referitoare la mecanismele de reglare a respirației mitocondriale în celulele *in vivo* au arătat că, în muşchiul cardiac şi în muşchiul scheletic de contracție lentă, valoarea *Km*-ului aparent pentru *ADP* este foarte mare, dar poate fi redusă semnificativ prin ruperea membranei mitocondriale exterioare sau prin

Scanned with OKEN Scanner

digerarea selectivă a anumitor sisteme de proteine citoplasmatice de către tripsină sau de către alte proteaze [326, 340, 343, 351]. De asemenea, afinitatea mitocondriei la *ADP* poate fi mărită cu un ordin de magnitudine prin izolare mitocondrială [343]. Aceste rezultate au condus la presupunerea că permeabilitatea porilor porini (*VDAC*) din membrana mitocondrială externă pentru *ADP* (şi, probabil, pentru *ATP*), în aceste celule, poate fi controlată (modulată) de anumite proteine citoplasmatice, ipotetic aflate în relație cu citoscheletonul [340, 343]. Evident, pentru a înțelege mecanismul celular al reglării respirației mitocondriale şi a fluxurilor de energie,este de o importanță majoră să identificăm această structură proteinică ce poate controla permeabilitatea porilor porini din membrana mitocondrială externă şi, de asemenea, rolul potențial al difuzieiADP-ului în interiorul celulelor. De o egală importanță este înțelegerea semnificației funcționale a conexiunilor dintre elementele citoscheletonului şi mitocondrii, frecvent observate la microscopia electronică. Rezultatele detaliate ale studierii unora dintre aceste probleme sunt prezentate în materialul de față. Ele ne permit să conchidem că există o relație evidentă între organizarea structurală a celulei şi proprietățile funcționale ale mitocondriei *in vivo*,

Scanned with OKEN Scanner

iar desmina ca atare nu pare a fi un factor care să controleze direct *VDAC*.

Rezultatele acestui studiu arată că valorile înalte ale *Km*-ului aparent pentru *ADP*, în reglarea respirației mitocondriale din celulele muşchilor cardiac şi de contracție lentă nu sunt dependente de consumarea rapidă a *ADP*-ului sau de slaba sa difuziune dinspre exterior în interiorul celulelor ci, cel mai probabil, se află în relație cu manifestarea unui factor proteinic necunoscut, care controlează permeabilitatea la adeninnucleotide a porilor porini din membrana mitocondrială externă. Mai mult, rezultatele arată că desmina în sine nu poate controla permeabilitatea membranei mitocondriale externe la *ADP*, dar absența sa completă din celulele musculare ale şoarecilor transgenici Des -/- induce apariția unor populații mitocondriale distincte morfologic şi funcțional, din cauza structurii celulare dezorganizate.

Rezultatele acestei lucrări,la fel ca şi cele ale unor studii anterioare asupra cardiomiocitelor şi a fibrelor permeabilizate relevă [206, 326, 331, 340, 343, 351, 353, 358, 401,] că, în contrast cu mitocondriile izolate, care au, independent de țesut, un foarte scăzut *Km* aparent pentru *ADP*, mitocondriile din celulele *in vivo* prezintă o specificitate tisulară a mecanismului de reglare a respirației prin *ADP*. Acest fenomen este ilustrat

Scanned with OKEN Scanner

foarte clar în *Figura 6* din acest studiu. Specificitatea tisulară a afinității mitocondriale la *ADP* exclude explicația joasei afinități la *ADP* în celulele cu activitate oxidativă intensă – în celulele mușchiului *soleus*, în inimă, dar și în ficat și creier [331, 358] – prin difuzia limitată a *ADP*-ului dinspre exteriorul celulelor, de vreme ce în celulele mușchiului scheletic de contracție rapidă aceste probleme de difuzie ar putea fi chiar mai mari decât în celulele cardiace, din cauza diametrului mai mare al celor dintâi. Nu există diferențe între valorile *Km*-ului aparent pentru *ADP* la comparația dintre fibrele permeabilizate prelevate din inimă și din mușchiul *soleus*, în ciuda unei întreite diferențe a V*max*, iar scăderea ritmului respirator de la 6,5 la 2,5 *nmol/min/mg* masă uscată datorată inhibării respirației în fibrele permeabilizate ale mușchiului *soleus* reduce valoarea *Km*-ului aparent numai cu 30%, iar cea mai joasă valoare a *Km*-ului aparent pentru *ADP* continuă să o depășească pe aceea pentru mușchiul scheletic decontracție rapidă (sau pentru mitocondriile *in vitro*).Această scădere cu 30% poate exercita o anumită influență în difuzia *ADP*-ului din exterior spre interior, dar poate fi explicată, de asemenea, prin factori cinetici, ca de exemplu redistribuirea forței de control între

Scanned with OKEN Scanner

sistemele membranare mitocondriale extern şi intern, datorită folosirii inhibitorilor.

Fenomenul specificității tisulare a reglării respirației prin *ADP* invalidează de asemenea explicarea valorilor înalte ale *Km*-ului aparent pentru *ADP* în celulele cardiace *in vivo* prin efectul de detergent, propus de curând de Wiseman şi colaboratorii [430].

Explicația s-a bazat pe date recente furnizate de Bygrave & Lehninger, cu privire la particulele submitocondriale produse de digitonină [61], dar ignorându-se diferențele de concentrație în detergentul folosit: pentru a produce preparatul de matrice membranară mitocondrială internă, digitonina trebuie folosită în concentrație de 6 mg/ml [61], dar chiar şi aceste procedee arată o foarte mare afinitate la *ADP*, fără nici un efect inhibitor [111]. Pentru a pregăti particulele submitocondriale trebuie ca, în continuare, să creştem concentrația detergentului folosit. Totuşi, pentru a produce celule sau fibre permeabilizate, de regulă se foloseşte saponina în concentrație foarte mică, pentru a dizolva selectiv sarcolema. Începând cu studiile lui Endo şi Kitazava, în 1978, şi apoi în multe alte lucrări, saponina este folosită în acest scop în concentrație de 50 *μg/ml* (0,05 *mg/ml*), adică în concentrație de 100 de ori mai mică decât cea utilizată pentru prepararea matricei

Scanned with OKEN Scanner

membranei interne din mitocondrie [65, 105, 125, 229, 299]. Acest fapt se datorează, pe de o parte, conținutului crescut de colesterol în plasmalema celulelor, care o depăşeşte semnificativ pe aceea din membranele mitocondriale şi, pe de cealaltă parte, înaltei afinități a saponinei la colesterol [125].

Multe studii prin microscopie electronică şi funcționale, inclusiv cele ale grupurilor Altschuld [65] şi Penman [229, 299] precum şi studii ale noastre mai recente [351] au arătat perfecta păstrarea structurilor intracelulare, inclusiv a membranei mitocondriale externe şi legăturile dintre citoscheleton şi mitocondrii în aceste celule permeabilizate.

Observațiile experimentale privitoare la ruperea membranei mitocondriale externe prin edematierea mitocondriilor în condiții hipoosmotice [331, 351] şi tratarea celulelor permeabilizate cu enzime proteolitice care, ambele, scad *Km*-ul aparent pentru *ADP*, formează fundamentul concluziei că, în celulele cu valori mari ale *Km*-ului aparent pentru *ADP*, permeabilitatea porilor porini din membrana exterioară este controlată printr-o proteină citoplasmatică sau prin anumite structuri proteinice [340, 343].

Scanned with OKEN Scanner

De vreme ce valori mari ale *Km*-ului aparent pentru *ADP* sunt, de asemenea, observate în cardiomiocitele-*fantomă*, după îndepărtarea tuturor proteinelor solubile şi chiar a miozinei, se poate crede că proteina care controlează permeabilitatea membranei mitocondriale externe este oarecum asociată cu anumite structuri celulare, cel mai probabil cu citoscheletonul. Cardiomiocitele-*fantomă* pot fi considerate drept cel mai simplu sistem celular lipsit de orice proteină solubilă şi de miozină, în care proprietățile mitocondriale sunt încă similare cu acelea din celulele *in vivo*.

Liu & Colombini [232], apoi Holden & Colombini [152] au găsit proteina modulatoare conservată a canalelor porinice (*VDAC*) în preparatele mitocondriale izolate din diferite surse. Nu este exclus ca această proteină conservată să aibă o anume relație cu factorul proteinic legat de citoscheleton, de exemplu, reprezentând o fracție reziduală, care contaminează preparate mitocondriale izolate. Mai mult, s-a descoperit că porinul de tip **1** (*VDAC*) este vizibil în diferite compartimente celulare, iar combinarea *VDAC*-ului cu diferite proteine modulatoare poate determina rolurile sale specifice în diferite poziții din celulă [315].

Scanned with OKEN Scanner

În numeroase studii ultrastructurale asupra celulelor, prin microscopie electronică, legăturile dintre elementele mitocondriilor şi citoscheleton au fost observate încă din 1967 [30, 222]. Cele mai avansate cercetări privind această problemă aparţin echipelor Leterrier şi Linden, care au identificat proteinele asociate la microtubuli (MAP_2) ce interacţionează cu domeniul care conţine porini din membrana mitocondrială externă a celulelor cerebrale [222, 231]. Mai mult, proteine neindentificate, recunoscute prin anticorpi în toate subunităţile filamentelor intermediare, s-au descoperita fi în conexiune ori cu suprafaţa mitocondrială, ori cu microtubulii [222]. S-a crezut că aceste conexiuni servesc dislocării mitocondriilor în celule [30, 173]. Mai amănunţit, motilitatea mitocondrială şi schimbările de formă în diferite tipuri de celule vii non-musculare datorate interacţiunilor lor cu citoscheletonul, au fost prezentate de Bereiter-Hahn & Voth [30]. Aceşti autori au descris, de asemenea, un foarte interesant fenomen de răspuns morfologic întârziat al mitocondriilor la ATP sau ADP micro-injectat în celule vii, indicând că difuzia acestor molecule este de aproape 10 ori mai lentă decât aceea din alte molecule hidrofilice mici [30].

Scanned with OKEN Scanner

Această observație este în concordanță cu rezultatele noastre, care arată permeabilitatea controlată şi scăzută la adeninnucleotide a membranelor mitocondriale, ce determină scăderea afinității mitocondriilor *in vivo* la *ADP* de mai mult de 10 ori [326, 351, 340, 343]. Grupul Penman a elaborat o tehnică specială simplă pentru vizualizarea conexiunilor membranelor citoplasmatice cu citoscheletonul [229, 299]. Pentru aceasta au utilizat microscopia electronică ce produce imagini de contrast înalt, fără a mai fi nevoie de colorare [229]. Pentru a extrage din celule proteinele solubile, care pot afecta claritatea imaginilor citoscheletonului, au folosit saponina (0,01% v/v sau 100 *μg/ml*) [229, 299], ceea ce, practic, este aceeaşi tehnică de permeabilizare folosită de noi. Rezultatele muncii lor arată multiplele legături dintre citoscheleton şi membranele mitocondriale [229, 299]. Aceste conexiuni sunt considerate ca importante pentru localizarea mitocondriilor în celule şi organizarea structurală a sistemelor celulare [229]. Rezultatele noastre confirmă această concluzie şi arată, de asemenea, că aceste contacte pot fi importante pentru controlul unor funcții mitocondriale majore, cum ar fi afinitatea la *ADP*-ul citoplasmatic [326, 351, 340, 343].

Scanned with OKEN Scanner

Cum, tehnica imunodeterminării a evidențiat conexiunile dintre filamentele intermediare şi mitocondrii [8, 68, 214, 236, 370] şi, în special, dintre filamentele de desmină şi mitocondrii, filamentele intermediare de desmină se află printre posibilii candidați la controlul permeabilității membranei mitocondriale externe pentru adeninnucleotide *in vivo*.

Rezultatele acestei investigații oferă un răspuns clar la întrebarea dacă conexiunile dintre filamentele intermediare de desmină şi mitocondrii controlează funcția acestora şi dacă desmina este componenta sistemului citoscheletic care controlează permeabilitatea porilor porini din membrana mitocondrială externă. Răspunsul este "*nu*", pentru următoarele motive:

- – muşchiul scheletic de contracție rapidă conține desmină, dar permeabilitatea membranei mitocondriale externe pentru ADP nu este controlată şi nici foarte mare;
- – în şoarecii transgenici homozigoți Des -/- afinitatea mitocondrială la ADP în cea mai mare parte a fibrelor permeabilizate, recoltate din inimă şi muşchiul *soleus* rămâne încă scăzută;

Scanned with OKEN Scanner

❖

– în cardiomiocitele permeabilizate recoltate din inimă de şobolan, legarea (*binding*) anticorpilor anti-desmină nu schimbă valoarea Km-ului aparent pentru ADP. De curând am observat că nici modificarea sistemului microtubular prin colcichină sau taxol nici a microfilamentelor prin citocalazină nu schimbă valorile înalte ale *Km*-ului aparent în fibrele cardiace permeabilizate [358].

Aceste trei filamente – microtubuli, microfilamente şi filamente intermediare – constituie, după măsurătorile biochimice recente, nu mai mult de 20% din citostructură.

Totuşi, am făcutde asemenea o altă observație interesantă.

În inimă şi în muşchiul *soleus* valorile ridicate ale *Km*-ului aparent pentru *ADP* se observă în celulele care păstrează o ultrastructură celulară înalt organizată. Această „*superstructură*" – o putem numi aşa datorită organizării ei superioare şi rezistenței ferme la tratament agresiv – se poate observa în cardiomiocitele-*fantomă*, în care găsim, de asemenea, valori mari ale *Km*-ului aparent pentru *ADP*. Poziția mitocondriilor în celulele-*fantomă* urmează un tipar striat datorită răspândirii filamentelor de desmină de la liniile Z

Scanned with OKEN Scanner

în spațiul dintre mitocondrii şi în spațiul intermiofibrilar. Acest fapt este în concordanță cu observațiile imunochimice ale lui Lockard şi Bloom [236] şi, de fapt, în foarte multe micrografii electronice, mitocondriile(dacă nu apar grupate, în celule) par a fi separate una de alta la nivelul liniilor **Z** [370]. Totuşi, nu se cunoaşte ce proteină, în afară de desmină, participă în această organizare structurală. Observațiile morfologice din această lucrare evidențiază aspectul celulelor cu anomalii morfologice şi structură dezorganizată din inimile şoarecilor transgenici şi, cel mai probabil, aceste schimbări structurale sunt responsabile pentru aspectul populației de mitocondrii cu afinitate crescută pentru *ADP*. Aceasta arată că există, probabil, o strânsă legătură între organizarea structurală a celulei şi mecanismul celular de reglare a *ADP*-ului şi fluxurile de energie. Probabil că o asemenea dezorganizare structurală are drept consecință disocierea sau îndepărtarea factorului de control *VDAC* pe care îl căutăm, de pe suprafața mitocondrială.

Scăderea V*max* în fibrele muşchiului *soleus* poate fi pusă în legătură cu scăderea conținutului de mitocondrii din aceste celule modificate sau chiar cu eliberarea lor în mediul din grupurile subsarcolemale, în timpul pregătirii fibrelor

Scanned with OKEN Scanner

permeabilizate. În general, acest fapt întăreşte concluzia anterioară că desmina este esențială pentru consolidarea integrității celulelor din muşchii scheletici, cardiac şi netezi [228].

Există două explicații posibile pentru rolul fiziologic al permeabilității controlate a membranei mitocondriale externe pentru adeninnucleotide *in vivo*.

- În primul rând, aceasta augmentează compartimentarea adeninnucleotidelor în celule şi creşte importanța sistemului creatinchinază în transferul energiei intracelulare [325, 353].
- În al doilea rând, structurile celulare care controlează permeabilitatea mitocondrială pentru *ADP* pot participa la construirea căii de transmitere a vectorului ligand pentru transducția semnalului *feedback* în celulele cu necesități mari de energie, aşa cum a fost propus în termeni generali de către P. Mitchel [325].

În acest caz, permeabilitatea membranei externe a mitcondriilor este mare în celule numai pentru *ADP*-ul exogen, în timp ce ar putea exista o cale organizată structural pentru canalizarea *ADP* în citoplasmă, cu participarea reacțiilor

Scanned with OKEN Scanner

creatinchinazei şi miochinazei [331, 340, 343, 354, 358]. O foarte interesantă observaţie a fost făcută, recent, de către Velasco şi colaboratorii, care au descoperit că, în hepatocitele permeabilizate, carnitin-palmitoil-transferaza I din membrana mitocondrială externă este controlată de componentele extramitocondriale ale celulei, cel mai probabil asociate cu citoscheletonul şi influenţată de integritatea citoscheletică [405].

Totuşi, identificarea factorilor celulari care controlează permeabilitatea porilor porini ai membranei mitocondriale externe în celulele musculare cu activitate oxidativă înaltă, necesită pe viitor multă muncă şi investigaţii aprofundate.

2. 5. APLICAŢII CLINICE ALE TEHNICII FIBREI PERMEABILIZATE

2. 5. 1. Detectarea miopatiilor mitocondriale

Disfuncţia mitocondriei se regăseşte în tot mai multe afecţiuni neuromusculare. Ţesutul muscular rămâne prima opţiune în diagnosticarea citopatiilor mitocondriale, de vreme ce defectele mitocondriale sunt, cel mai adesea, vizibile în muşchi. S-a demonstrat că heteroplasmia *ADNmt* poate apărea la om, iar această boală se poate asocia cu afecţiuni ale genomului mitocondrial

Scanned with OKEN Scanner

datorate fie mutațiilor prin eliminare, fie mutațiilor punctuale [190]. În analiza funcțională a capacității de fosforilare oxidativă, măsurarea vitezelor maximale ale respirației mitocondriale este adesea utilizată pentru determinarea diverselor defecte mitocondriale. S-a arătat că evaluarea activităților respiratorii şi a răspunsurilor fibrelor permeabilizate sunt aplicabile în special studiului mitocondriei din muşchiul uman, datorită preîntâmpinării izolării mitocondriale şi micşorarea cantității de țesut (20-50 *mg* masă umedă) necesară acestei evaluări. Ca şi fibrele din muşchiul cardiac (vezi mai sus), fibrele permeabilizate din muşchiul scheletic uman se comportă ca mitocondriile izolate: respirația substratelor mitocondriale poate fi stimulată prin *ADP* cu o valoare a *RCI*-ului ridicată, inhibat prin carboxiatractilosidă [200] şi este posibilă detectarea unor schimbări de fluorescență a *NAD(P)H*-ului şi a flavoproteinelor fluorescente, la adăugări de substrat, *ADP* şi cianură [199, 429]. Cum am expus anterior, o comparație a vitezelor respirației per citocrom aa_3conținutul mitocondriilordin muşchiul uman izolat şi din fibrele permeabilizate cu saponină, a relevat faptul că mai mult de 85% din mitocondriile acestei fibre sunt accesibile pentru investigarea fosforilării oxidative [200]. Am aplicat această metodă pentru a studia schimbările

Scanned with OKEN Scanner

funcționale ale mitocondriilor la pacienții cu miopatie mitocondrială (*oftalmoplegie cronică progresivă externă, Morbus Leigh şi depleția ADNmt*). Valorile vitezelor maximale ale respirației în aceste fibre şi a activităților corespunzătoare ale citratsintazei în biopsiile muşchilor scheletici sunt indicate în *Tabelul* 2.

	defect mtDNA	Citrat sintaza	Succ + rot	Glu + mal
martor (N= 84)	-	8.7 ± 3.8	9.2 ± 1.9	8.6 ± 1.9
S.B. (CPEO)	67% of 11.9 kb Δ mtDNA	11.4 ± 0.1	5.3	6.6 ± 0.1 (n = 2)
M.K. (CPEO)	missing *Apa I* restriction site	12.0 ± 0.3	6.1 ± 0.2 (n = 2)	5.3
M.T. (CPEO)	53% of 14.3 kb Δ mtDNA	125 ± 0.2	8.3 ± 2.1 (n = 4)	6.2 ± 0.8 (n = 3)
K.G. (CPEO)	84% of 12 kb Δ mtDNA	34.8 ± 1.7	5.6 ± 1 (n= 8)	3.4 ± 0.6 (n = 14)
T.W. (CPEO)	65% of 11.6 kb Δ mtDNA	11.0 ± 0.1	9.3 ± 1.1 (n = 6)	7.9 ± 1.7 (n = 10)
E.B. (Morbus Leigh, complex I deficiency)	none (?)	13.2 ± 0.3	8.9 ± 1.5 (n = 12)	6.1 ± 0.8 (n = 10)
N.N. (mtDNA D)	24% of wt mtDNA	9.1 ± 0.3	6.3 ± 0.9 (n = 6)	5.2 ± 0.5 (n = 10)
D.S. (complex I deficiency)	none (?)	17.4 ± 1.1	9.8 ± 0.9 (n = 4)	8.6 ± 1.2 (n = 10)

***Tabel 2.* Activități respiratorii mitocondriale maximale ale fibrei musculare umane permeabilizate cu saponină, de la pacienții cu miopatii mitocondriale.**

Vitezele respiratorii (exprimate în nmoliO_2/min/mg masăuscată, la 25^{0}C) au fost determinate utilizând substratele 10mM succinat + 10 µM rotenonă (*succ+rot*) sau 10mM glutamat +5mM

Scanned with OKEN Scanner

malat (*glu+mal*) în prezența a 1 mM ADP. Activitățile citratsintazei în biopsiesunt date în U/g masă umedă (la 30°C). N – numărul pacienților ortopedici, n – numărul determinărilor independente, CPEO-oftalmoplegie cronică progresivă externă, ADNmt D – depleția mitocondrială DNA.

După cum reiese din tabel, în multe cazuri poate fi observată o creştere adaptațională în conținutul mitocondrial (citratsintaza), ca răspuns la afecțiunea mitocondrială. Pe de cealaltă parte, vitezele respirației în fibrele permeabilizate cu saponină (exprimată per mg masă uscată),sunt mai mici. Astfel, determinarea vitezei maxime a respirației în fibrele permeabilizate este o metodă folositoare pentru investigarea (*screening*) eşantioanelor de biopsie de la pacienți suspecți de afecțiuni mitocondriale. Cu toate acestea, nu în toate cazurile diferențele dintre vitezele maximale ale respirației sunt semnificative din punct de vedere statistic. Pentru a vizualiza mici defecte şi a localiza deficiențe enzimatice utilizând preparate de fibre permeabilizate, experimentele de titrare prin aplicare de inhibitori specifici sunt deosebit de utile [209].

În *Figura 12* sunt arătate experimente de titrare cu rotenonă a respirației maximale susținute cu glutamat + malat. Fibrele permeabilizate de la

Scanned with OKEN Scanner

pacienții cu deficiențe de *tip complex* I (D. S, K. G) manifestă o mult mai înaltă sensibilitate la inhibitorii specifici ai acestei enzime.

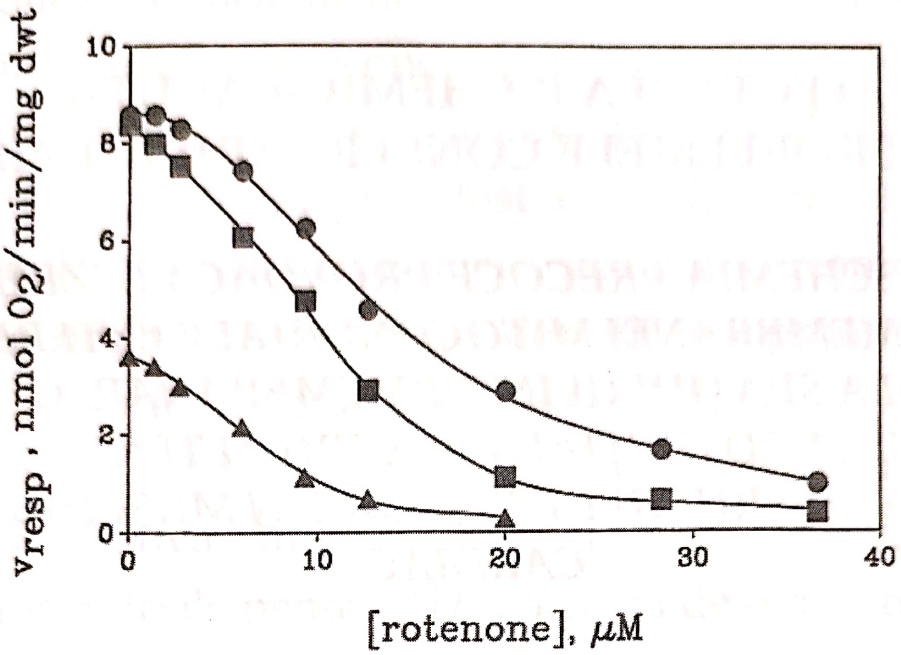


Fig. 12. **Titrări cu rotenonă a respirației stimulate cu ADP din fibrele musculare tratate cu saponină. Cercuri – pacienți ortopedici, 1,7mg masă uscată; pătrate – pacienți D.S., 2,0mg masă uscată; triunghiuri – pacienți K.G., 2,2mg masă uscată de fibre permeabilizate în mediu pentru măsurători ale respirației conținând 1 mM ADP , 10 mM glutamat şi 5 mM malat.**

Descrierea cantitativă a acestor curbe de titrare în cadrul analizei controlului metabolic a indicat coeficienți ridicați în controlul fluxului enzimei afectate: pentru D.S. coeficientul de control al fluxului a fost de 0,54± 0,02, iar pentru K.G de 0,46 ± 0,01 (valoarea de control: 0,16 ± 0, 05, n = 11).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 3

AFECTAREA ISCHEMICĂ ACUTĂ ŞI PROBLEMELE CONSERVĂRII INIMII

3.1. ISCHEMIA PRECOCE PROVOACĂ LEZIUNI ALE MEMBRANEI MITOCONDRIALE EXTERNE ŞI A SPAȚIULUI INTERMEMBRANAR: O CAUZĂ POTENȚIALĂ PENTRU ALTERAREA TRANSFERULUI DE ENERGIE ÎN MUŞCHIUL CARDIAC

În inima ischemică, cea mai rapidă modificare celulară este tumefierea mitocondriei, ceea ce produce ruperea membranei mitocondriale exterioare sau disocierea creatinkinazei din membrana mitocondrială interioară. De aceea, respirația stimulată de creatină este un indicator deosebit de sensibil al afecțiunii ischemice şi, în acelaşi timp, al eficienței protecției cardioplegice a inimii în *chirurgia cardiacă*. Aceste rezultate sunt relatate pe larg, în continuare.

Obiectivul nostru a fost să analizăm atent schimbările ce intervin în timp şi afectează funcția mitocondrială a celulelor miocardului, *pe durata unui* şi *după un* episod ischemic. În acest scop, au

Scanned with OKEN Scanner

fost evaluate variabilele ce caracterizează funcția mitocondrială, pe mostre de miocard izolate de la șoareci, aflate în faze diferite de ischemie. Tehnica fibrelor permeabilizate a fost folosită pentru a evalua funcția mitocondrială în timp ce se menține structura intracelulară. Cea mai precoce alterare ce a putut fi detectată a fost o scădere în efectul stimulator al creatinei asupra respirației mitocondriale. Alterarea a devenit mai pronunțată pe măsură ce gravitatea (*sau durata*) ischemiei creştea. Ulterior a apărut, de asemenea, o scădere semnificativă în *Km*-ul aparent al respirației mitocondriale pentru *ADP*, urmată de o diminuare a ritmului respirației maxime, care a fost parțial restabilit prin adăugare de citocrom *c*. În sfârşit, pentru cele mai grave forme de ischemie, ritmul respirației bazale a crescut de asemenea. Aceste observații atrag atenția asupra unei secvențe de modificări care afectează mai întâi spațiul intermembranar, apoi membrana mitocondrială externă şi, în final, membrana internă. Analiza se concentrează asupra alterărilor precoce, care nu pot fi detectate folosind tehnicile convenționale ale mitocondriilor izolate.

Susținem că aceste alterări în spațiul intermembranar şi în membrana mitocondrială externă pot induce distorsiuni, atât în canalizarea

Scanned with OKEN Scanner

energiei dinspre mitocondrii, cât şi în semnalizarea spre mitocondrii.

Vom evoca potențialele consecințe asupra reglării producerii de energie (*ATP, PCr*) prin intermediul mitocondriilor.

Alterarea progresivă a funcției mitocondriale, care apare în cursul unei ischemii susținute a țesutului miocardic, are consecințe cruciale asupra funcției mecanice a inimii în reperfuzie şi asupra viabilității cardiomiocitelor. Numeroase studii au fost consacrate evaluării funcției mitocondriilor izolate din țesut, în diferite faze de ischemie şi reperfuzie [304, 314]). Orice injurie a mitocondriei poate afecta:

- **1** – *componentele lanțului respirator, dintre care o pierdere de citocrom* **c** *pare a fi efectul cel mai precoce;*
- **2** – *transportul de ADP şi ATP prin membrana mitocondrială internă mediată de translocator adenin-nucleotide;*
- **3** – *permeabilitatea membranei mitocondriale interne, a cărei creştere conduce la o disipare a potențialului electrochimic, în timp ce componentele lanțului respirator sunt afectate.*

În caz contrar, energia respiratorie poate fi deviată de la producerea oxidativă de ATP,

Scanned with OKEN Scanner

datorită circuitului de Ca^{2+} în exces trecând prin membrana internă, pe seama gradientului de protoni. În final, se activează degradarea ATP-ului unei rețele mitocondriale şi, în acelaşi timp, deschiderea „porilor" conduce la o edematiere a mitocondriilor.

Alterările cauzate de ischemie la nivelul compartimentului mitocondrial extern, *id est* spațiul intermembranar n-au fost până acum studiate în mod amănunțit. Motivul fiind acela că acest compartiment este puternic dezintegrat în timpul izolării standard a mitocondriilor, deprimând ariile structurale de contact dintre cele două membrane create prin mai multe kinaze [57]. Totuşi, în procesele de reglare a transportului şi de schimb dintre mitocondrii şi alte compartimente celulare,integritatea membranei mitocondriale externe şi a ariilor de contact pare a fi din ce în ce mai importantă [58, 59, 120, 311, 369]. Din punct de vedere fiziologic,membrana mitocondrială externă pare a nu fi de la sine permeabilă la adeninnucleotide, datorită proprietăților porinului şi/sau unei presupuse proteine necunoscute, asociate cu partea externă a porinului [343]. Putem considera asocierea funcțională a creatinkinazei mitocondriale, atât cu adenilat-translocatorul membranei interne, cât şi cu porinul din

Scanned with OKEN Scanner

membrana externă, ca pe un sistem de canalizare moleculară a energiei (sub formă de fosfocreatină) din mitocondrie şi creatină, din citosol, jucând rolul unui semnal [416, 433].

Datele experimentale privitoare la modificările care au loc în timpul ischemiei la acest nivel al canalizării energiei şi la semnalizarea moleculară dintre mitocondrii şi alte structuri celulare sunt insuficiente.

O scădere a activității creatinkinazei mitocondriale, în timpul ischemiei, a fost evidențiată [41], ceea ce sugerează apariția unor injurii în spațiul mitocondrial intermembranar. Tehnica fibrei permeabilizate [402], care permite studierea funcționării mitocondriilor, în timp ce organitele rămân în interiorul celulei, pare a fi foarte potrivită pentru această investigație. Utilizând această tehnică, Veksler *et al.* [345], Saks *et al.* [400] au detectat o scădere a efectului stimulator al creatinei asupra respirației mitocondriale după un episod de ischemie. În mod asemănător, am obținut date experimentale pe fibră din inimi izolate de şobolani, supuse la ischemie rece pe termen lung [180] şi la ischemie normotermică (37°C) [181], ceea ce a reflectat alterări la nivelul membranei externe şi în spațiul intermembranar al mitocondriilor.

Scanned with OKEN Scanner

În acest studiu, ne-am propus să interpretăm rezultatele obținute în lumina considerațiilor de mai sus, cu intenția de a identifica cele mai precoce modificări ale funcției mitocondriale în timpul episodului ischemic şi să analizăm consecințele posibile asupra echilibrului energetic şi funcției mecanice a miocardului ischemic şi reperfuzat.

*
* *

Toate experimentele au fost făcute pe inimi prelevate de la şobolani masculi Wistar, cântărind 300-350 g, după anestezie cu pentobarbital de sodiu (50mg/kg corp).

Inimile au fost perfuzate cu soluție fiziologică (în mM:NaCl 129; KCl 5,6 $MgCl_2$ 2,4; $CaCl_2$ 2,5 $NaHCO_3$ 21; glucoză 11, hexanoat 1), la presiune de 100 KP_a, 37°C, izovolumic. Variabilele funcționale au fost măsurate constant, folosind un balon intraventricular din latex. Ischemia a fost provocată reducând fluxul coronarian la 0,1 *ml/min* pentru 15 sau 30 de minute. Inimile au fost apoi reperfuzate timp de 10 minute,înainte de prelevarea mostrelor pentru izolarea de fibre. În alt grup, inimile au fost supuse la o ischemie totală, timp de 60 de minute, la 37°C.

Scanned with OKEN Scanner

Inimile au fost supuse cardioplegiei *in situ*, apoi izolate şi păstrate pentru 6 sau 15 ore, fie scufundate în soluție cardioplegică (în mM:MgCl, 16; NaCl 147; KCl 20 şi $CaCl_2$ 0,5) sau perfuzate la viteză mică (0,3 ml/minut) cu aceeaşi soluție. Mostrele pentru preparatele de fibră au fost prelevate la sfârşitul perioadei de conservare.

Variabilele funcționale (presiunea dezvoltată în ventriculul stâng, dp/dt max, ritm cardiac) au fost evaluate utilizând un balon intraventricular cu presiune diastolică ajustată la 5 mmHg.

3. 1. 1. Funcția respiratorie mitocondrială

Într-un grup de control, inimile au fost rapid prelevate şi scufundate în soluție la 4°C. Fibrele permeabilizate au fost imediat pregătite pentru determinarea funcției respiratorii mitocondriale.

La sfârşitul protocolului de ischemie reperfuzată, a fost indus stopul cardiac printr-o perfuzie de soluție cardioplegică *St. Thomas*, în mM: $MgCl_2$ 16; NaCl 147; KCl 20; $CaCl_2$ 0,5. Un volum de 20 ml la 4°C din această soluție a fost suficient pentru a opri rapid activitatea cardiacă. Mostre de miocard au fost prelevate şi scufundate la 4°C pentru prepararea fibrei.

Scanned with OKEN Scanner

Această metodă a fost descrisă şi exhaustiv discutată în capitolele anterioare. Variabilele funcției mitocondriale, care au putut fi evaluate, sunt:

1. ritmurile respiratorii: ritm bazal (cu substrat, dar fără ADP:$V_{substrat}$), ritm maxim (cu substrat + 1 sau 2 m MADP:V_{max})
2. Km-ul aparent pentru ADP
3. efectul stimulator al creatinei (20 mM), evaluată la concentrații diferite ale ADP-ului şi un indiceal acestui efect cu 0,1 mMADP: '(VCr-VADP)/VADP'
4. testul cu citocrom *c*: efectul adăugării de citocrom c asupra ritmului maximal (V_{max}), evaluat într-o soluție conținând KCl (125 mM)
5. Indicele de Control al Acceptorului (ICA/ACR) = V_{max} / $V_{substrat}$

*

* *

Rezultatele experimentale privind variabilele funcției mitocondriale, evaluate prin utilizarea tehnicii fibrei permeabilizate, în diverse stări de ischemie, sunt prezentate în *Figura 13*.

Scanned with OKEN Scanner

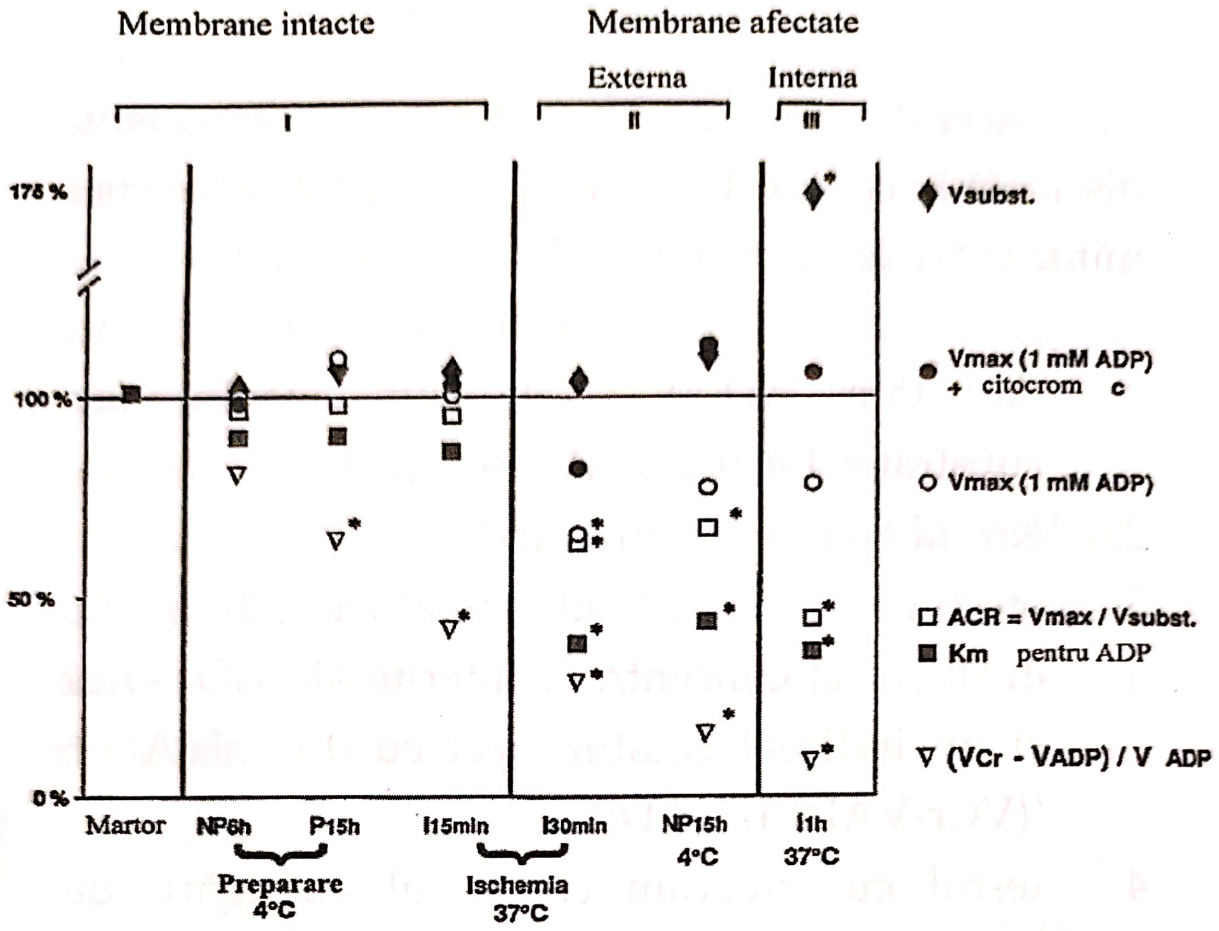


Fig. 13. **Schimbările relative în variabilele respirației mitocondriale în funcție de severitatea ischemiei. Toate variabilele evaluate sunt exprimate ca procente a valorilor măsurate pe fibre prelevate de la inimă *in situ*. Pentru a explica figura, valorile medii constatate pe 5-8 inimi explantate sunt raportate fără indicarea deviației standard. Diferența $p<0,05$ din condițiile de control a fost verificată prin utilizarea unei analize statistice pe baza valorilor absolute. Pentru definirea variabilelor evaluate a se vedea *Materiale şi metode*. Conservare la 4^{0}C: perfuzie lentă pentru 15h(P_{15h}), imersie timp de 6 şi 15h (NP_{6h} and NP_{15h}). Ischemia–37^{0}C: flux coronarian 0,1 ml/min pentru 15-30 min. (I_{15min} şi I_{30min}), global total pentru 1h (I_{1h}).**

O remarcă importantă trebuie făcută înainte de orice altă interpretare:rezultatele experimentale

Scanned with OKEN Scanner

se referă la o *populație de mitocondrii*. În ciuda faptului că fibrele detaşate au fost întotdeauna prelevate din aceeaşi arie restrânsă din miocard, s-ar putea suspecta faptul că injuria provocată de ischemie poate afecta în mod diferit celulele, în funcție de poziționarea lor în țesut. Mai mult, în interiorul unui cardiomiocit dat, mitocondriile pot fi afectate în grade diferite din cauza poziției lor în celulă şi/sau din cauza vârstei organitului. Prin urmare, variabilele evaluate sunt reprezentative pentru un cuantum dintr-o populație de mitocondrii, posibil afectate în mod diferit. Deoarece nu e posibilă prelevarea selectivă a unei mostre omogene de mitocondrii, avansăm ipoteza că secvența alterărilor observate global este similară cu secvența injuriilor dintr-o singură mitocondrie.

Efectul stimulator al creatinei este vizualizat în imagine prin creşterea relativă a ritmului respirației, când s-a adăugat creatină (20 mM) la fibrele ce respiră sub efectul a 0,1 mM de ADP. Acest indice exprimă faptul că, în exces fiind, creatina pătrunde în spațiul intermembranar al mitocondriilor şi induce producerea de *ADP* direct la nivelul adeninnucleotid-translocazei, în timp ce transferul *ADP*-ului prin membrana externă este sub control. Într-adevăr, s-a arătat anterior [351, 330] că, *Km*-ul aparent, ce caracterizează controlul

Scanned with OKEN Scanner

ritmului respirator prin ADP, este mult mai înalt (300 μM) când evaluarea are loc pe fibre permeabilizate şi nu pe mitocondrii izolate (20-30 μM). Această observaţie a fost interpretată ca reflectând existenţa unei bariere de difuzie pentru *ADP* şi mai multe lucrări experimentale au condus la concluzia că membrana mitocondrială externă este responsabilă de acest fenomen [340, 343, 352].

*Figura 14*A înfăţişează gradarea alterărilor ce apar atunci când gravitatea stărilor de ischemie se accentuează.

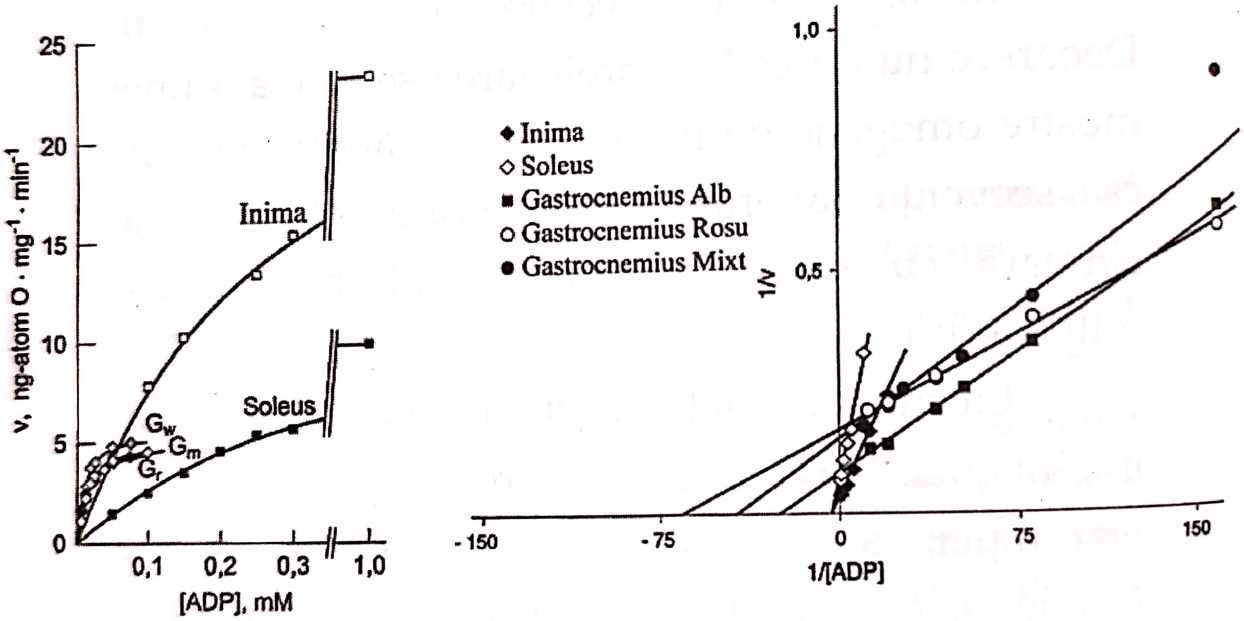


Fig. 14. **(A) Dependenţa frecvenţei respiraţiei fibrelor permeabilizate ale inimii şi ale muşchilor scheletici *soleus* şi *gastrocnemius* alb(a), roşu(r) şi mixt (m) de o concentraţie extremă a ADP-ului în mediu. De notat că frecvenţa maximă a respiraţiei este rapid atinsă de *gastrocnemius* dar nu şi de *soleus* şi de muşchii cardiaci. (B) Analiza datelor de la Fig. 14 A în graficele dublu-reciproce.**

Scanned with OKEN Scanner

Cum se poate observa, în stări de ischemie uşoară: 15 minute la 37°C, 6 ore pentru inimi în asistolie (stop cardiac) la 4°C sau chiar 15 ore conservare la 4°C cu perfuzie la viteză mică, singura variabilă care se poate modifica este efectul stimulator al creatinei.

În această fază a ischemiei, variabilele ce caracterizează ritmurile respiratorii ($V_{substrat}$ sau V_{max}) au rămas neschimbate. Cum nu a existat nici un efect al citocromului *c*, se poate presupune că membrana mitocondrială externă a fost intactă. Totuşi, o anume modificare în permeabilitatea acesteia la ADP putea apărea în anumite mitocondrii, de vreme ce *Km*-ul aparent pentru ADPa fost uşor (dar nu semnificativ) scăzut.

Pentru situații de ischemie mai severă: 30 minute la 37°C sau 15 ore de conservare la 4°C fără perfuzie, efectul stimulator al creatinei a scăzut, de asemenea, şi a survenit o semnificativă diminuare a Km-ului aparent pentru *ADP* (cu aproximativ 50%).

În ceea ce priveşte ritmul respirator, măsurat în prezența unei concentrații înalte de ADP (1mM), care este ritmul respirator maximal (V_{max}, Starea3), o scădere semnificativă a apărut numai în fibrele din inimile supuse celor mai severe stări de ischemie.

Scanned with OKEN Scanner

Cel puțin parțial, acest efect poate fi pus pe seama unei pierderi de citocrom *c*, de vreme ce adăugarea de citocrom c exogen, parțial (în inimi cu ischemie normotermică) sau total (în inimi conservate) a restabilit ritmul respirator. Pierderea de citocrom *c* poate fi interpretată ca o consecință a unei rupturia membranei mitocondriale externe, un fenomen ce nu se evidențiază în stările de ischemie uşoară din acest studiu. Când corectarea ritmului respirator cu ajutorul citocromului *c* exogen a fost completă,se poate presupune că nu s-a produs nici o alterare a membranei interne şi că „maşinăria" mitcondrială, cum ar fi lanțul respirator, a fost intactă.

Ritmul respirator, evaluat în absența *ADP*-ului ($V_{substrat}$), s-a modificat simțitor (*a crescut*) numai în cele mai grave stări de ischemie din studiile noastre: *i.e.* 60 de minute de ischemie la 37°C. Aceasta înseamnă că membrana mitocondrială internă s-a modificat, în aceste condiții, conducând la o slăbire a *forței motrice a protonilor* (*proton-motive force*, PMF).

În acest stadiu al procesului ischemic se poate spune că mitocondria este ireversibil afectată odată ce au fost afectate atât membrana externă, cât şi cea internă.

Din aceste rezultate se poate presupune că alterările ce apar în diferite zone ale mitocondriei

Scanned with OKEN Scanner

pe durata atacului ischemic survin în urma unei succesiuni de evenimente, care pot fi ordonate schematic după cum urmează:

- În *prima fază*, membrana mitocondrială externă este încă intactă şi alterarea principală vizează efectul stimulator al creatinei. La acest nivel, funcția miocardului în reperfuzie rămâne diminuată cu 20-50%.

- Într-o *a doua fază*, membrana mitocondrială externă este afectată şi toate variabilele funcției mitocondriale sunt modificate, exceptând ritmul respirației bazale. În acest stadiu, funcția mecanică este grav compromisă (*10% rezidual*).

- În *sfârşit*, când membrana mitocondrială internă este alterată, aşa cum se pune în evidență prin creşterea valorii $V_{substrat}$, cardiomiocitul nu-şi reia activitatea contractilă la reperfuzare.

*

* *

Rezultatele noastre experimentale, arată, toate, că o modificare precoce a funcției energetice a cardiomiocitelor constituie o scădere a efectului

Scanned with OKEN Scanner

stimulator al creatinei în respirația mitocondrială. Acest fenomen este într-adevăr prima schimbare semnificativă ce poate fi detectată utilizând tehnica fibrelor permeabilizate, într-un stadiu când nici o altă alterare nu poate fi statistic demonstrată. Fiindcă tehnica evaluează activitatea medie a unei populații de mitocondrii, nu se poate exclude faptul că aceste organite pot fi diferit afectate în funcție de poziția lor în celulă sau de poziția celulei față de vasele sanguine. Totuşi, de vreme ce amploarea schimbării observate în efectul creatinei a fost considerabil mai mare decât alterările celorlalte variabile mitocondriale şi a crescut odată cu gravitatea stărilor de ischemie, pare a fi rezonabil să considerăm că această modificare indusă de ischemie apare înaintea oricărei alteia. Ulterior, alte alterări, care pot fi atribuite rupturii membranei mitocondriale externe, sunt puse în evidență prin refacerea parțială sau completă a ritmului respirator maximal sub efectul adăugării de citocrom *c*. În cele mai grave stări de ischemie au apărut, de asemenea, alterări în membrana mitocondrială internă şi în lanțul respirator.

Să concentrăm această discuție asupra modificărilor precoce. Se admite, în general, că,în condiții fiziologice, creatinkinaza mitocondrială (CrK_m) leagă simultan, atât membrana externă, cât şi pe cea internă, fiind funcțional cuplată la ANT

Scanned with OKEN Scanner

(adeninnucleotid-translocaza) membranei interne şi la porinul membranei externe.

Acest complex de multienzime permite sinteza fosfocreatinei (PCr) departe de echilibrul reacției CrK_m. Aceasta favorizează o canalizarea creatinei, acționând ca un semnal care stimulează producerea de ADP direct la nivelul ANT, şi a PCr, fiind produsul final al funcției mitocondriale. În plus, poate apărea o limitare a difuziei ADP-ului (şi adeninnucleotidelor) prin membrana mitocondrială externă şi s-a emis ipoteza [266] că un factor proteinic, posibil asociat citoscheletonului, joacă un rol important în limitarea permeabilității pentru ADP. În experimentele cu fibre permeabilizate, din cauza barierei de difuzie pentru ADP, ADP-ul exogen adăugat trebuie să atingă concentrații înalte (300-400 μM), pentru a permite o rată a difuziei ADP-ului prin membrana externă, suficientă pentru inducerea unei creşteri a concentrației ADP-ului apropiată de ANT la valori pe scala Km-ului pentru ADP estimate în mitocondrii izolate (20 μM).

Scăderea efectului stimulator al creatinei în timpul ischemiei poate fi interpretată ca o consecință a scăderii activității creatinkinazei mitocondriale. O asemenea scădere a efectului stimulator al creatinei asupra respirației pe durata ischemiei a fost detectată anterior, folosind aceeaşi

Scanned with OKEN Scanner

tehnică a fibrelor permeabilizate. Totuşi, unii cercetători, Veksler *et al.*, au susținut că acest efect este reversibil la reperfuzie, în timp ce, în condițiile noastre experimentale, alterările persistă pentru cel puțin 10 minute de reperfuzare. Alți cercetători, utilizând tehnici diferite, au descris anterior alterările CrKm induse de ischemie. *Bittlet al.* [41] au arătat că o ischemie totală a inimii de iepure *in situ*are ca rezultat o diminuare aproape imediată a activității CrK_m.

O descreştere progresivă ulterioară a acestei activități, persistentă la reperfuzare, a fost direct corelată cu tulburările de contracție. O descreştere în activitatea CrK_ma fost, de asemenea, pusă în evidență de către Neubauer *et al.* [280] în țesutul ventricular stâng rezidual intact din inimă de şobolan cu infarct miocardic cronic. Totuşi, aceiaşi cercetători nu au detectat nici o descreştere în activitatea CrKm tisular dintr-o inimă ischemică de dihor, izolată [279].

Se pare, deci, că în ciuda variațiilor care se datorează, probabil, diferențelor existente în protocoalele experimentale sau în speciile utilizate, o alterare a activității CrK_m este un eveniment precoce, comun în ischemie.

Astfel, întrebarea care se ridică vizează atât natura, cât şi cauza acestor alterări. În experimentele lor care arată o scăderea activității

Scanned with OKEN Scanner

CrK_m indusă prin ischemie, Bittl *et al.* [41] n-au putut detecta nici o activitate a CrK_m în alte fracțiuni ale celulei decât în mitocondrii şi au sugerat că descreşterea survenită în activitatea CrK_ma rezultat dintr-o anumită denaturare sau degradare, fără eliberare de enzime. E posibil ca inactivarea acestei enzime să se petreacă în timpul ischemiei, datorită generării şi acțiunii radicalilor liberi ai oxigenului. S-a demonstrat, într-adevăr, că speciile de oxigen reactiv pot inhiba *CrK* microfibrilară [258] şi *CrK* mitocondrială [440], probabil prin modificarea grupărilor sulfhidril din proteina enzimei.

În plus, condițiile fizico-chimice prevalente în timpul ischemiei pot induce o eliberare de *CrK* din membrana mitcondrială internă. Acesta poate fi şi cazul încărcăturii osmolare care duce la edematierea celulară şi mitocondrială în timpul ischemiei [169]. Aceasta poate conduce, într-adevăr, la decuplarea enzimei de *ANT* şi porin. O creştere a concentrației de fosfat anorganic (P_i) poate fi considerată ca unul din posibilii factorii responsabili de un atare efect. Într-adevăr, în timpul ischemiei, concentrația P_i intracelular se apropie rapid de valorile din intervalul utilizat pentru solubilizarea *in vitro* a *CrK* din membrana mitocondrială internă [140, 410]. În timpul ischemiei precoce, solubilizarea CrK_m din

Scanned with OKEN Scanner

membrana internă nu este urmată de o pierdere de enzimă prin membrana exterioară, pentru că în acest interval o pierdere de citocrom *c* nu poate fi pusă în evidență. Totuşi, o alterare a relației strânse dintre *ANT*, CrK_m şi porin poate avea o consecință crucială în sine (*per se*) asupra eficacității canalizării energiei dinspre mitocondrii şi asupra transmiterii semnalului (*creatină*) spre mitocndrii. O detaşare a CrK_m poate rezulta într-o scăderea eficacității creatinei, considerată ca semnal extramitocondrial, dar şi într-o alterare a funcționării membranei mitocondriale externe. Se poate presupune că o perturbarea asocierii celor două membrane mitocondriale de asemenea poate facilita accesul *ADP*-ului citozolic în spațiul intermembranar, prin schimbări în structura porinului. Aceste modificări sunt puse în evidență prin scăderea *Km*-ului aparent pentru *ADP*, detectată mai târziu.

Totuşi, nu se poate exclude faptul că acest fenomen începe să apară mai devreme, chiar dacă statistic e nesemnificativ, datorită evaluării sale pe o populație largă de organite eterogen afectate. În plus, se poate presupune că un prezumtiv factor proteinic ce controlează permeabilitatea porinului [343] este, de asemenea, dislocat din cauza schimbărilor in compoziția chimică a celulei, pe

Scanned with OKEN Scanner

durata ischemiei sau din cauza constrângerilor fizice provocate de încărcătura osmolară.

Supoziția că alterările în permeabilitatea membranei mitocondriale externe şi în starea ionică a spațiului intermembranar sunt printre primele evenimente care apar în timpul ischemiei miocardice vine în concordanță cu teoria dezvoltată de Di Lisa şi Bernardi [92] despre evoluția ulterioară a membranei mitocondriale interne. Întradevăr aceşti autori sugerează că o creştere a concentrației intracelulare de *Ca*pe durata ischemiei poate favoriza deschiderea unui por de tranziție angajat în permeabilitatea mitocondrială sensibil la ciclosporină, conducând la o disipare a gradientului de protoni, şi accelerând astfel dezechilibrul energetic şi evoluția către o deteriorare ireversibilă a celulei. Noi sugerăm că alterările în permeabilitatea membranei externe apar mai devreme în cursul deteriorărilor induse de către ischemie, probabil atunci când creşterea concentrației de calciu intracelular nu este foarte pronunțată (aşa cum o sugerează lipsa contracturii); aceste alterări sunt probabil reversibile.

Mai târziu intervin schimbări mai puternice, care duc la ruperea membranei externe şi la scurgerea de citocrom *c*. Este foarte probabil ca şi membrana internă să fie afectată (*Figura* 2C). Mai mult, nu se poate exclude faptul că, la acest nivel,

Scanned with OKEN Scanner

pierderea integrității membranei externe contribuie ea însăşi la evoluția necrozei. În această privință este interesant să notăm că anumite molecule cu apoptoză regulată se află localizate pe membranele mitocondriale şi că eliberarea de citocrom *c* de către mitocondrii pare că participă la apoptoză [438].

În fine, dar nu în ultimul rând, se ridică întrebarea: pot asemenea alterări precoce ale membranei mitocondriale externe şi ale spațiului intermembranar să aibă consecințe asupra activității mecanice a muşchiului cardiac? În cazuri de ischemie severă pe inimi izolate de iepure (*30 de minute*) a fost detectată o pierdere progresivă şi ireversibilă în activitatea creatinkinazei mitocondriale şi a fost pusă în evidență o strânsă corelație a acestui declin cu scăderea performanței cardiace [41]. Viteza de reacție a creatinkinazei a scăzut proporțional cu durata ischemiei la o inimă izolată de dihor şi, din nou, a fost demonstrată o strânsă corelație liniară cu performanța cardiacă [279]. Totuşi, dat fiind că viteza de reacție a creatinkinazei este cu un ordin de mărime mai mare decât ratele maxime de sinteză a *ATP*-ului, nu se poate trage concluzia că transportul de fosfat cu nivel mare de energie *via* creatinkinaza este în mod direct o limitare pentru recuperarea funcției miocardului post-ischemic.

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai multe dintre experimentele în care a scăzut viteza de reacție a creatinkinazei, fie utilizând analogi ai creatinei, golind rezervele de *PCr* [175, 445], fie inhibând enzima [114, 141], au arătat că, mai degrabă decât capacitatea de a menține un nivel moderat de performanță, potențialul de a dezvolta şi de a susține un efort intens (*id est* rezerva contractilă) a fost serios compromisă. O astfel de avariere a rezervei de energie a fost de asemenea observată într-un reziduu de miocard rezidual intact de la şobolani cu infarct cronic [280]. În acest ultim model experimental activitatea izoenzimei creatinkinazei a scăzut, iar recuperarea mecanică după stres acut (*hipoxia*) a fost grav afectată. Se pare, deci, că integritatea oscilației *PCr*-ei precum şi integritatea *CrK* mitocondriale, când nu este necesară menținerea unui nivel scăzut al performanței, este absolut necesară fortificării rezervei contractile a inimii. Majoritatea studiilor experimentale a fost direcționată spre cercetarea rolului „transportului de energie" (sau canalizarea) a aşa-numitei oscilații a *PCr*-ei. Totuşi, conjugarea celor trei sisteme:*ANT*, CrK_m şi porin la nivel mitocondrial este implicată în reglarea aportului de creatină în mitocondrie şi regenerarea *ADP*-ului. În sfârşit, oscilația *PCr* poate fi, de asemenea, considerată ca importantă în reducerea timpului necesar structurii pentru a

Scanned with OKEN Scanner

atinge noi stări echilibrate după schimbările bruşte intervenite în cuantumul de efort. Sugerăm că alterările deosebit de precoce în controlul respirației mitocondriale creatini ce ar putea afecta în mod direct funcția de semnalizare a complexului multi-enzimatic (*incluzând* CrK_m) în spațiul intermembranar. Acest lucru poate fi evidențiat în special în timpul unei faze de tranziție ce însoțeşte schimbările bruşte intervenite în cuantumul de efort. O variabilă de mare interes în această privință este răspunsul pasager în consumul de oxigen, aşa cum a fost studiat de Van Beek *et al.* [395, 396]. Aceşti autori au găsit că, urmărind o cadență în ritmul cardiac, timpul mediu de răspuns al consumului de oxigen mitocondrial în inimi de iepure izolate, care este de aproape 7 secunde [396] în condiții normoxice, a crescut ca urmare a unei ischemii [395, 444] scurte (*15 minute*), ceea ce sugerează că transferul semnalului energetic trans-citozolic a fost întârziată. În acord cu aceste observații, putem emite ipoteza că, în timp ce capacitatea mitocondrială nu este afectată de scurte perioade de ischemie, permițând menținerea staționară a echilibrului energetic, timpul de răspuns este întârziat, creând un anumit dezechilibru energetic în timpul fazei de tranziție de la un nivel de efort la altul.

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie, propriile noastre rezultate experimentale, în acord şi cu alte date, vin în concordanță cu premisa că perturbările induse de ischemia precoce se produc în spațiul intermembranar al mitocondriei. Aceste alterări pot fi cauzate de perturbări anterioare precoce în homeostaza cardiomiocitului. Ele ar putea consta într-o anumită destructurare dintre CrK_m, ANT şi porin. În consecință, atât caracteristicile *canalizării energiei*, cât şi ale transferului *semnalelor* către mitocondrii sunt modificate. Cum aceste alterări nu par a fi rapid reversibile, reglarea transferului de energie în cardiomiocite ar putea fi considerabil afectată în miocardul post-ischemic reperfuzat.

3. 1. 2. Analiza unei mostre pentru biopsie din muşchiul interoseus de la mâna stângă în timpul unei operații de urgență

În *Figura 15* se vede în ce măsură tehnica fibrelor permeabilizate oferă informații biochimice. Unul din autorii acestui capitol a fost operat de profesorul F. Moutet, la Grenoble, la mâna stângă, pentru reconstrucția unui deget rupt într-un accident de maşină. În timpul operației, mostra pentru biopsie a fost luată din muşchiul de contracție lentă *interosseus* de la mâna stângă,

Scanned with OKEN Scanner

permeabilizat cu saponină şi analizat de către T. Tiivel, în Laboratorul de Bioenergetică de la Universitatea „Joseph Fourier", pentru determinarea cineticii reglării respirației prin *ADP*. În *Figura 15* se văd clar două populații mitocondriale. În acest caz se disting două faze cinetice ale reglării respirației (două populații de mitocondrii) chiar în analiza primară a datelor, în V_{02} *versus* graficul concentrației *ADP*. Şi, în mod clar, două populații de mitocondrii cu proprietăți foarte diferite sunt puse în evidență în graficele dublu-reciproce. O populație de mitocondrii se caracterizează printr-un *Km* aparent foarte înalt pentru ADP, egal cu 748 µM, care scade prin creatină la 400 µM (acest mai degrabă uşor efect al creatinei poate fi explicat printr-o anumită ischemie intraoperatorie), iar a doua populație este caracterizată printr-un foarte scăzut *Km* aparent pentru *ADP*, egal cu 18 *µM*. Diferența în *Km*-ul aparent pentru *ADP*, de 40 ori mai mare, explică de ce în acest caz se văd cu uşurință două populații de mitocondrii.

Cel mai probabil aceste două populații reprezintă tipuri de fibre diferite în această mostră de biopsie. Rata maximală totală a respirației este caracteristică pentru țesuturi cu activitate respiratorie intensă. Astfel, această mostră de biopsie ilustrează două lucruri importante: în țesutul muscular uman reglarea respirației

Scanned with OKEN Scanner

mitocondriale pare a fi specifică fiecărui tip de fibră şi în muşchii cu activitate respiratorie intensă este prezent factorul „x" – o proteină de natură încă necunoscută [331, 343] – ce exercită un puternic control asupra permeabilității membranei externe la *ADP*.

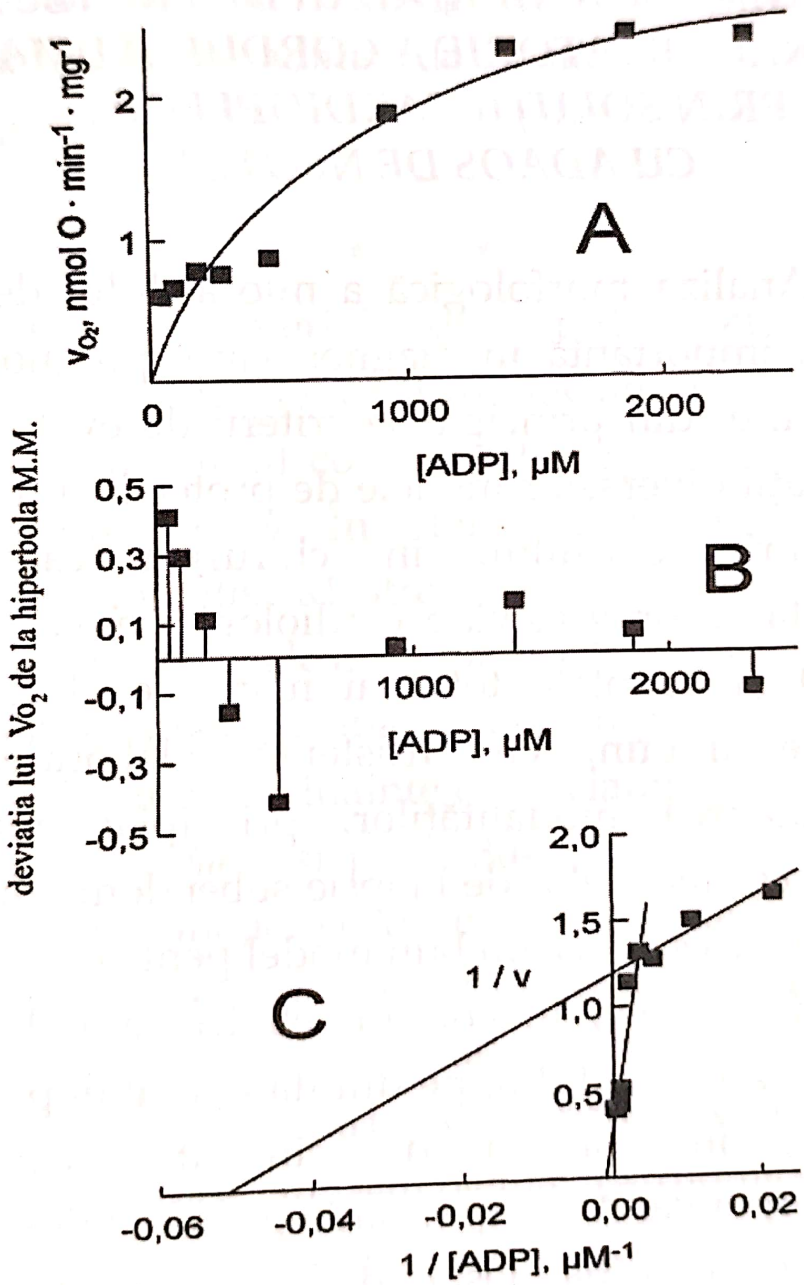


Fig. 15. **Analiza respiratorie a eşantioanelor de biopsie prelevate din m. *interossseous* (interosos dorsal), de la mâna**

Scanned with OKEN Scanner

stângă. (A) Rata respirației în funcție de concentrația de ADP; (B) Deviațiile de la hiperbolă ale valorilor experimentale; (C) graficul dublu reciproc al datelor de la 15 A.

3.2. CARACTERISTICA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE ŞI STRUCTURAL-BIOCHIMICE A GRADULUI DE PROTECȚIE INTRAOPERATORIE A CORDULUI UMAN PRIN SOLUȚII CARDIOPLEGICE CU ADAOS DE NEOTON

Analiza morfologică a miocardului devine tot mai importantă în diagnosticare, prognozare, dar şi unul din principalele criterii de evaluare a eficacității diverselor modele de protecție, utilizate în injuria cordului, în chirurgia cardiacă. Dezvoltarea progresivă a cardiologiei moleculare, evident şi cerințele tot mai mari ale chirurgiei cardiace impun, cu insistență, elaborarea şi îmbunătățirea modalităților, principial noi, în analiza eşantioanelor de biopsie subendomiocardică la om. În acest sens, un bun model pentru cercetare poate fi crearea, în condiții clinice, a ischemiei globale a miocardului, pe durata operației pe cord deschis, în condiții de circulație sanguină extracorporală. Această situație poate fi folosită nu numai în scop diagnostic, dar şi pentru studierea morfogenezei procesului ischemic în miocard şi

Scanned with OKEN Scanner

aprecierea rolului protector, în diverse soluții cardioplegice, utilizate pentru protejarea cordului.

În lucrarea de față noi prezentăm datele analizei morfologice şi ale parametrilor respirației mitocondriale, în mostre de biopsie a miocardului uman, la diverse etape de ischemie intraoperatorie, utilizând soluția cardioplegică în compoziția standard şi cu adaus de fosfocreatină (*Neoton Schiapparelli, Italia*).

*

* *

Drept material de studiu au servit eşantioanele de miocard prelevate de la 25 de pacienți, în timpul corecției chirurgicale a viciilor cardiace dobândite. În total au fost studiate circa 150 de bioptate. Mostrele de miocard au fost excizate din peretele anterior al ventriculului drept al inimii, imediat înaintea clampării aortei – *controlul* – imediat înainte de declamparea aortei – *ischemia maximă* – şi peste 30-45 de minute după restabilirea funcției cordului – *reperfuzie*. Mostrele de miocard pentru studiul electrono-microscopic au fost tratate prin metoda standard şi, ulterior, fixate cu lantan pentru evidențierea eventualelor defecte precoce în sarcolema cardiomiocitelor. Aprecierea stării mitocondriale şi a eficacității funcționării creatinkinazei s-a realizat folosind metoda de înregistrare a respirației fibrelor

Scanned with OKEN Scanner

musculare tratate cu saponină, descrisă anterior. Bioptatele, destinate studiului biochimic, au fost congelate rapid în azot lichid şi ulterior preparate pentru determinarea *ATP*-ului şi fosfocreatinei în ţesut, utilizând metoda standard prezentată mai sus. Prelevarea materialului în diverse etape ale operaţiei a făcut posibilă studierea în dinamică a modificărilor miocardice, survenite din momentul iniţial până la apariţia leziunilor ischemice şi de reperfuzie.

Pentru protecţia inimii, pe întreg parcursul ischemiei intraoperatorii, au fost utilizate soluţii cardioplegice sanguine şi cristaloide. Grupele de pacienţi au fost repartizate în aşa fel încât, din punct de vedere clinic şi al duratei ischemiei intraoperatorii, practic, nu se deosebeau. Durata medie de ocluzie a aortei a fost de 82 de minute. Pacienţii au fost repartizaţi conform clasificării newyorkeze, pe clasele funcţionale: CF I-II – gravitate medie, CF III-IY – stare gravă.

*

* *

Studiul electrono-microscopic al materialului de control a relevat importante leziuni eterogene ale cardiomiocitelor contractile. Zonele lezate prezentau edemaţierea uşoară a mitocondriilor, apariţia bulelor de lipide, reducerea conţinutului de glicogen, marginalizarea şi agregarea

Scanned with OKEN Scanner

cromatinei, cu menținerea în stare bună a fibrelor miocardului. Astfel de modificări, după cum se ştie, sunt provocate de injuriile ischemice ale cardiomiocitelor. O parte din celule prezentau: vezicularea şi vacuolizarea reticulului sarcoplasmatic, hipercontractilitate şi liza miofibrilelor, ceea ce sugerează apariția, în aceste cardiomiocite, a elementelor ultrastructurale de suprasolicitare cu calciu. Modificările menționate aveau grade diferite şi variau atât în dependență de clasa funcțională a insuficienței cardiace, cât şi în limitele aceleiaşi arii miocardice. Această situație pune mari probleme în evaluarea modificărilor ultrastructurale din miocard, chiar în etapa de control-*martor*,utilizând metoda obişnuită de preparare a bioptatelor. Pentru ca această metodă să devină mai eficientă noi am folosit drept componentă fixatoare lantanul, în calitate de trasor transmembranar electrono-microscopic.

Analiza bioptatelor inimilor umane fixate cu lantan a relevat, în anumite cazuri, că particulele trasorului erau localizate preponderent în spațiul intercelular. În alte cazuri, lantanul pătrundea în interiorul majorității celulelor, localizându-se pe suprafața membranei exteriore a mitocondriei.

Analizând raportul clinico-morfologic am constatat că leziunile sarcolemei, la majoritatea cardiomiocitelor contractile, se înregistrează în

Scanned with OKEN Scanner

lotul pacienților cu insuficiență cardiacă gravă (CF III-IY NYHA), în timp ce, la bolnavii cu insuficiență cardiacă moderată (CF I-II NYHA), membrana adiacentă a acestor celule era doar parțial permeabilă pentru lantan.

Astfel, analiza mostrelor miocardice fixate cu lantan, cu toată eterogenitatea modificărilor ultrastructurale, în cazul în care se utilizează metoda de rutină, a făcut posibilă interpretarea mai diferențiată a materialului *martor* – de control şi relevarea corelației dintre clasa funcțională de insuficiență cardiacă şi gradul de extindere a proceselor lezionale cardiomiocitare.

Majoritatea modificărilor intracelulare a fost condiționată de boala de fond, ce au condus la hipertrofia miocardului şi dezvoltarea insuficienței cardiace. Modificările menționate se caracterizau prin leziuni de focar ale cardiomiocitelor, de tip ischemic şi hipoxic; de asemenea puteau fi determinate de suprasolicitarea cu calciu a acestor celule.

Pentru analiza obiectivă a rezultatelor obținute a fost necesară elaborarea criteriilor integrale de diagnosticare diferențiată, fundamentate pe analiza cantitativă a componentelor structurale ale cardiomiocitelor, în limitele bioptatului.

Scanned with OKEN Scanner

De menționat este că eficacitatea aprecierii cantitative a electronogramelor în evaluarea mostrelor prelevate din inimile umane a fost demonstrată într-un număr de lucrări; de aceea, această metodă a fost folosită de noi ca bază. Pentru informații suplimentare, însă, s-au luat în considerare şi rezultatele obținute de noi la fixarea materialului cu lantan.

Pentru analiza cantitativă a 10 electronograme, obținute din trei blocuri ale unei mostre, cu amplificare de 10000, au fost estimate, în puncte-convenționale, modificările ultrastructurale din mitocondrii, nuclee, reticulul sarcoplasmatic, sarcomere; de asemenea, s-a luat în calcul conținutul glicogenului cardiomiocitar, al lipidelor şi al celulelor, procentual, cu sarcolema deteriorată, folosind pentru vizualizarea defectelor trasorul transmembranar – lantanul. Pentru estimarea cantitativă a modificărilor organitelor intracelulare folosite drept elemente de control, am utilizat o scală de şapte puncte, în care s-a consemnat dinamica leziunilor de care s-a ținut cont la evaluarea componentelor de bază, celulare. Cuantificarea modificărilor calitative în miocard a fost exprimată prin estimarea mediei aritmetice a sumei punctelor obținute, ca index ultrastructural integral şi interpretată în felul următor:

Scanned with OKEN Scanner

- *modificări*-

- *uşoare:* (+) – (++)
- *moderate:* (++) – (+++)
- *grave:* (+++) – (++++)
- *foarte grave* (++++) – (+++++)

În acest fel, analiza integrală a *mostrelor-martor* a făcut posibilă repartizarea grupelor de pacienți, cu modificări structurale inițiale, de diverse grade, în timp ce evaluarea clinică a stării pacienților a permis delimitarea lor în două grupe. Acest fapt a sporit gradul de diferențiere a caracteristicilor bioptatelor, în sens de diagnostic diferențial, şi a servit drept punct de plecare pentru analiza ulterioară a modificărilor structurale în miocard, la *valoarea maximă a ischemiei* şi la *reperfuzie*, permițând o estimare mai pertinentă a efectelor soluțiilor cardioplegice, utilizate în practica clinică.

Trebuie specificat faptul că evoluția proceselor ischemice în miocardul bolnavilor, în timpul operațiilor pe cord deschis, comportă anumite particularități. Acestea se explică prin faptul că leziunile generalizate ale cardiomiocitelor, în ischemia globală, sporesc modificările de fond existente în miocard, determinate de procesele patologice de bază şi

Scanned with OKEN Scanner

depind esențialmente de calitatea soluțiilor cardioplegice. Analizând efectul protector al soluțiilor cardioplegice sanguine şi cristaloide, utilizând metoda propusă, noi nu am reținut diferențe semnificative în caracterul lor protector, în situația în care perioada de ischemie nu depăşea 90 de minute [362, 330]. Concentrațiile mari de potasiu şi hipotermia au asigurat o protecție evidentă a miocardului. Mitocondriile au rămas, practic, nemodificate, iar conținutul de glicogen a fostdepistat în cantități suficient de mari.

Particulele trasorului au fost identificate în interiorul celulelor, pe suprafața exterioară a membranei mitocondriale, în cazurile în care s-au constatat elemente ultrastructurale, de supra-solicitare cu calciu. Indicele ultrastructural integral, de regulă, s-a aflat în concordanță cu datele de control – *martor*. Numai în cazul în care inima a fost scoasă din circulația sanguină (*mai mult de 90 minute*), efectul protector al soluțiilor cardioplegice cristaloidea devenit mai puțin evident. Acest fapt s-a manifestat prin creşterea elementelor suprasolicitării cu calciu, vacuolizarea reticulului sarcoplasmatic, hipercontracția sarcomerilor şi eliminarea glicogenului. În această investigație procentul celulelor cu conținut de lantan în sarcoplasmă a crescut până la 60-75%, iar indicele ultrastructural integral a avansat cu un punct.

Scanned with OKEN Scanner

Aşadar, în caz de ocluzie de lungă durată a aortei, efectul cardioprotector al soluției cristaloide a fost mai puțin evident comparativ cu cel sanguin. În consecință considerăm că o caracterizare mai adecvată, privind efectele protectoare ale soluțiilor poate fi făcută numai prin studierea pe termen lung a ischemiei intraoperatorii în miocard. O etapă extrem de importantă în aprecierea influenței protectoare a soluțiilor cardioplegice o constituie analiza leziunilor postreperfuzie a miocardului, în etapa de restabilire a activității cordului. Se ştie că în această etapă survin modificări progresive în structura cardiomiocitelor şi, ulterior, apare o scădere a rezervelor adeninnucleotidelor. În aceste condiții, este necesară evaluarea efectului profilactic al soluțiilor cardioplegice în prevenirea leziunilor de reperfuzie. Cercetările noastre au demonstrat că, la etapa de reperfuzie, practic în toate cazurile, cresc simptomele de suprasolicitare ultrastructurală a cardiomiocitelor contractile cu calciu. Aceasta se manifestă prin vacuolizarea reticulului sarcoplasmatic, hipercontractilitatea sarcomerilor şi coincide cu creşterea procentuală a celulelor care conțin în sarcoplasmă lantan. În aceste cazuri, de regulă, se constată o tumefiere a mitocondriilor şi o scăderea conținutului de glicogen. Soluția cardioplegică cristaloidă exercită, în acest caz, un

Scanned with OKEN Scanner

mai mic efect preventiv, în etapa de reperfuzie, în raport cu soluția sanguină. Indicele ultrastructural integral creşte cu un punct, comparativ cu coeficienții preischemici. Datele morfologice s-au aflat într-o strânsă corelare cu rezultatele analizei conținutului legăturilor macroergice. În particular, nivelul *ATP*-ului şi al fosfocreatinei a scăzut la sfârşitul perioadei de ischemie şi al reperfuziei, într-o mai mare măsură în cazul protecției cordului cu soluție cristaloidă, comparativ cu cardioplegia sanguină. Aşadar, efectulprotector al soluțiilor cardioplegice se manifestă într-un mai mare grad în etapa de reperfuzie şi constituie, considerăm, cel mai important element de caracterizare a soluțiilor cu diverse compoziții. Evaluarea modificărilor structural-biochimice în miocard relevă apariția – în ambele grupe – a leziunilor reversibile ale cardiomiocitelor protejate cu soluție cristaloidă, care, atât în perioada de ischemie,cât şi în etapa de reperfuzie, pot agrava evoluția insuficienței cardiace postoperatorii precoce. Acest fapt, la rându-i, impune imperios necesitatea îmbunătățirii, în continuare, a compoziției soluțiilor cardioplegice.

Bazându-ne pe supozițiile teoretice expuse într-un număr de lucrări, pentru perspectivă, considerăm ca absolut necesară utilizarea fosfocreatinei exogene în componența acestor soluții, deoarece, cu deosebire neotonul

Scanned with OKEN Scanner

corespunde din mai multe puncte de vedere principiului de bază al cadioplegiilor – menținerea stocului de fosfați macroergici şi prezintă o determinantă importantă în reglarea homeostaziei cardiomiocitelor funcționale.

În soluțiile menționate mai sus, am adăugat fosfocreatină (*neoton*), concentrația finală, constituind 8 – 10 *mmol/litru*. Analiza morfologică a mostrelor de miocard a evidențiat o acțiune pozitivă a neotonului utilizat în componența soluțiilor cardioplegice sanguine şi cristaloide. Acest lucru s-a caracterizat, în primul rând, printr-un vădit efect protector al preparatului asupra integrității structurale sarcolemale. Procentual, celulele care conțineau lantan la punctul maxim al ischemiei s-au redus considerabil, în raport cu indicii preischemici, chiar şi la pacienții foarte gravi, în condițiile în care inima era scoasă din circulația sanguină pe termen îndelungat. Particulele trasorului s-au localizat în spațiul intercelular şi nu au pătruns în interiorul celulelor. Un astfel de efect favorabil al neotonului a fost observat atât în componența soluției cardioplegice sanguine, cât şi în cea cristaloidă. În această serie de cercetări, noi nu am înregistrat vreo înrăutățire, în dinamică, a indicelui ultrastructural integral, comparativ cu parametrii preischemici. Reducerea intensității alterării ultrastructurilor a

Scanned with OKEN Scanner

cardiomiocitelor contractile în membrana adiacentă, credem că poate fi explicată prin acțiunea pozitivă a neotonului asupra glicocalixului.

Suplimentarea de neoton în soluțiile cardioplegice standard, înlătură,practic în totalitate leziunile cardiomiocitelor contractile, la etapa de reperfuzie. Chiar şi în grupele bolnavilor gravi, indicele ultrastructurii integrale nu s-a modificat în raport cu parametrii ischemici şi cu cei de control-*martor*. Acest lucru se explică prin faptul că adaosul de neoton în compoziția soluțiilor cardioplegice previne dinamica negativă a modificărilor structurale în cardiomiocite şi creează o protecție sigură a sarcolemei împotriva leziunilor, în etapa de reperfuzie. Particulele trasorului s-au localizat, cel mai adesea, în spațiile discurilor intercalare sau în cel intercelular, în pofida prezenței modificărilor reversibile importante ale organitelor, în anumite cardiomiocite. Protejarea sarcolemei, în cazul leziunilor, a crescut şansele de regenerare intracelulară ulterioară.

Cu toate acestea, o analiză mai amănunțită a soluțiilor cu supliment de fosfocreatină a demonstrat faptul că adaosul acesteia în compoziția soluției cardioplegice sanguină, asigură un mai bun efect protector, chiar şi la cei mai gravi pacienți (*numai 30% din celule au avut sarcolema deteriorată*), în timp ce, în soluția cristaloidă, în anumite situații, la

Scanned with OKEN Scanner

pacienți similari, particulele trasorului au fost identificate în sacoplasmă (*până la 60% din cardiomiocite*).

Rezultatele morfologice concordă cu evaluarea biochimică a mostrelor, în această etapă operatorie. Conținutul *ATP*-ului, practic, nu s-a modificat, comparativ cu indicii inițiali, iar concentrația fosfocreatinei a crescut chiar, la adausul acestui preparat, în componența soluției cardioplegice sanguine.

În consecință, analizând rezultatele obținute în studierea efectului protector al neotonului, ca adaos la soluțiile cardioplegice standard, trebuie reținută acțiunea lui pozitivă asupra structurii cardiomiocitelor contractile şi, ceea ce este foarte important, asupra sarcolemei lor şi a conservării macroergilor, atât în procesele ischemice, cât şi la etapa de reperfuzie. În acest context, considerăm că şi conținutul soluției cardioplegice joacă un rol direct şi extrem de important în profilaxia complicațiilor postreperfuzie, care se întâlnesc, inexorabil, după declamparea aortei şi restabilirea funcției cadiace. Acțiunea protectoare a fosfocreatinei asupra sarcolemei, a cărei distrucție, în condiții de ischemie, este considerată una din cauzele majore în deteriorarea cordului, poate fi una din verigile care pun în lumină efectul acestui preparat, ca supliment farmacologic nou, în

Scanned with OKEN Scanner

soluțiile cardioplegice clasice. Conform concepției larg acceptate, mecanismul leziunilor ischemice al cadiomiocitelor include în sine nu numai consecințele carenței de oxigen şi energie, dar şi efectul negativ de acumulare a produşilor metabolismului şi catabolismului. În principal, acțiunea distructivă asupra membranei li se atribuie lizofosfatidelor, care se acumulează în cardiomiocitele ischemice. Datele recente, obținute în studii experimentale, au arătat că fosfocreatina inhibă complet creşterea nivelului lizofosfatidilcolinei şi al lizofosfatidiletanolaminei în fracția neprelucrată a membranei sarcolemale din miocardul ischemiat, ceea ce poate servi ca unul din posibilele mecanisme prin care este protejată membrana adiacentă a cardiomiocitelor contractile. Evaluarea stării mitocondriale şi a eficacității funcționării creatinkinazei mitocondriale realizate, cum am arătat mai sus, folosind metoda înregistrării respirației fibrelor musculare tratate cu saponină, a scos în evidență următorii parametri ai respirației mitocondriale (*Figura 4*): a) viteza respiratorie maximă, calculată pe mg per cantitate uscată, b) acceptorul de control al respirației – raportului ratelor maximale şi bazale a eşantioanelor de biopsie-*martor*, în ischemie şi după reperfuzie, în timpul operației. Se observă că ischemia miocardului provoacă modificări

Scanned with OKEN Scanner

importante ai parametrilor cercetați. Aceste modificări sunt,în parte, reversibile după reperfuzie; în soluțiile cardioplegice în care nu a fost folosită fosfocreatina restabilirea a fost parțială (*Figurile 16A* şi *16B*).

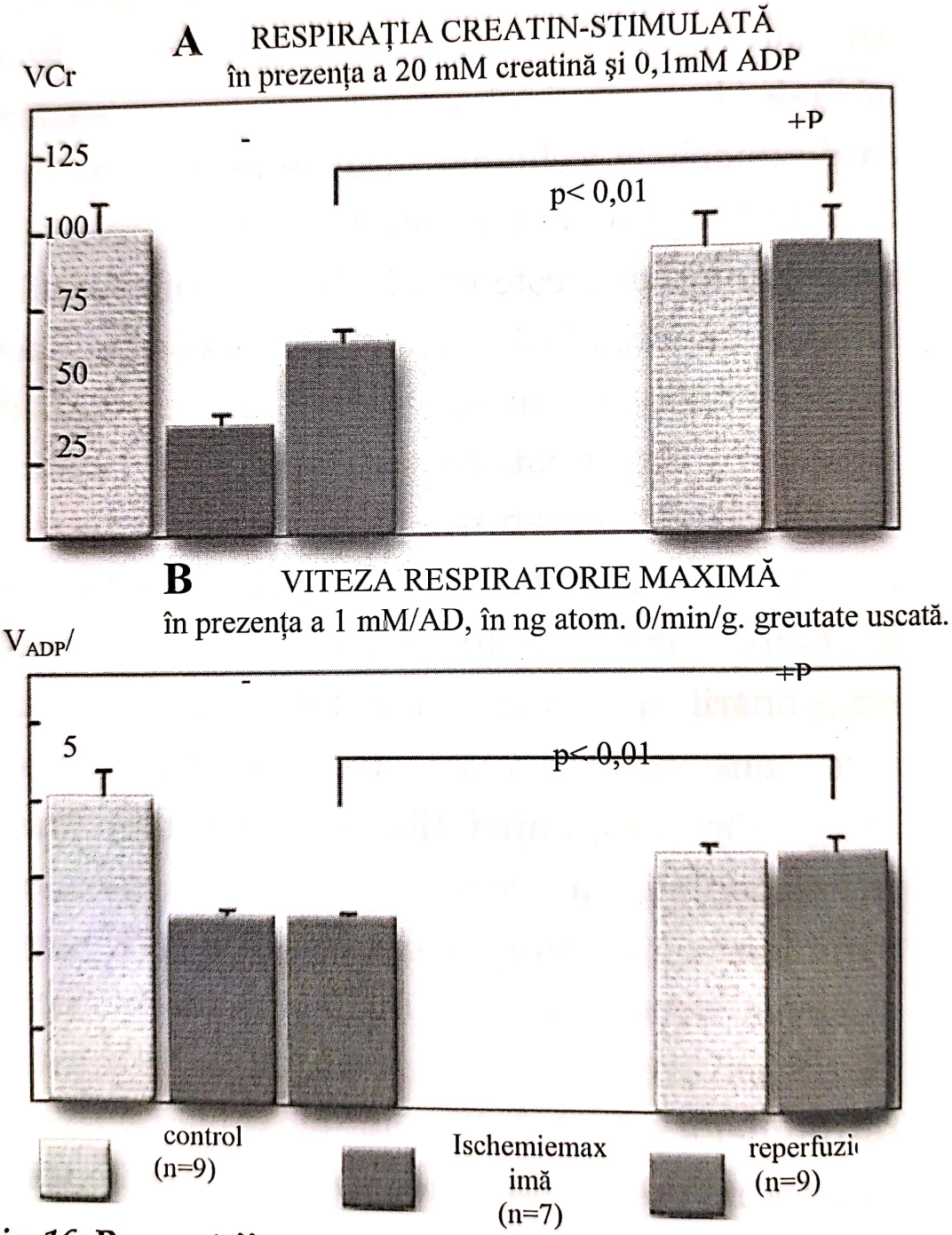


Fig. 16. **Parametrii respirației mitocondriale în bioptatele miocardice intraoperatorii la pacienții cu reumatism**

Scanned with OKEN Scanner

Mai pregnantă – de trei ori – a fost respirația creatin-stimulată (*Figura 16A*), ceea ce denotă alterarea sistemului creatinkinazei mitocondriale. Acest fapt are loc, cel mai probabil, din cauza disocierii creatinkinazei de membrană şi a dereglării conjugării funcționale dintre procesele de fosforilare oxidativă şi reacția cretinkinazei. Restabilirea respirației creatin-stimulate poate fi obținută de reasocierea fermentului. După cum se observă (*Figura 16A*), în prezența fosfocreatinei, refacerea creatinkinazei a fost totală.

În concluzie, utilizarea fosfocreatinei în componența soluțiilor cardioplegice previne în cvasitotalitate alterarea mitocondrială în muşchiul cardiac, în timpul operațiilor de protezare valvulară pe cord deschis, asigurând, astfel, un nivel adecvat de sinteză a energiei.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 4

CARDIOMIOPATII

4.1. *ANALIZA MOSTRELOR PENTRU BIOPSIE*

Vom analiza înainte de toate schimbările din sistemul creatinchinazei, în energia celulară, reglarea respirației şi alterările parametrilor contractilității la animalele experimentale cardiomiopatice (*hamsteri miopatici*), apoi, în capitolul următor vom prezenta una dintre cele mai eficiente utilizări ale tehnicii fibrei permeabilizate, în medicina clinică – analiza materialului de biopsie prelevat din endomicardul inimilor pacienților cu cardiomiopatie dilatativă în timpul controlului angiografic, care a constituit, în fapt, obiectivul investigaților noastre finale [51, 187, 330].

4. 1. 1. Sistemul creatinchinazei şi cardiomiopatia

Cardiomiopatia, prin investigații experimentale, s-a stabilit că este caracterizată prin

Scanned with OKEN Scanner

scăderea statusului energetic în cardiomiocite. Aceste schimbări includ alterările tipului şi nivelului de expresie al enzimelor din metabolismul energetic, cum ar fi enzima şi creatinchinaza, scăderea nivelelor tisulare ale fosfaților înalt energetici şi un nivel scăzut al funcționării contractile. Din momentul în care izoenzimele creatinchinazei au fost considerate ca fiind implicate în integrarea metabolismului energetic, prin lanțul reacțiilor producătoare de energie şi utilizate pe calea fosfocreatinei, am fost interesați de caracteristicile de detaliu şi cantitative în sistemul creatinchinazei în miocardul cardiomiopatic.

4. 1. 3. Determinarea activității creatinchinazei şi a citocromului *aa3*

Activitatea creatinchinazei a fost estimată prin reacția inversă (producerea *ATP* din *ADP* şi fosfocretină) la 30°C şi 340 *nm*, aşa cum am precizat anterior [329, 333].

Pentru determinarea conținutului în citocrom ***aa3***, omogenizatul de țesut cardiac (100 *mg* de țesut/*ml*) a fost tratat de 5 ori cu o soluție conținând 0,1 *moli* acid tricloric ($pH = 8, 0$) , 0, 2 μM EGTA, 0,5% tritron şi diferențele de spectru în

Scanned with OKEN Scanner

gama de lungimi de undă 525-630 *nm* au fost înregistrate cu spectrometrul *Shimadzu-UV-260*, după reducerea citocromului ***aa3*** de către ditionitul de sodiu. Conținutul în citocrom ***aa3*** a fost calculat prin valoarea absorbției maxime la 605 *nm*, utilizând un coeficient de extincție de 24 *mmoli-1xcm-1*.

Separarea electroforetică a izoenzimelor creatinchinazei a fost utilizată pe gel de agaroză 1% la 2°C, după cum s-a menționat mai sus [186].

Tabelul 3 rezumă alterările parametrilor energetici celulari, în inimile miopatice, înregistrați prin utilizarea tehnicii 7^{31}-*NMR*. Conținuturile din creatina totală – fosfocreatina şi *ATP*-ul – au fost toate scăzute cu 40%. Fluxul de energie, prin sistemul creatinchinazei, a fost diminuat până la 50% şi s-a constatat şi o tendință de descreştere a raportului dintre fluxul de energie şi activitatea creatinchinazei totale cu 17% (eficiența sistemului creatinchinazei).

***Tabel 3.* Parametrii bazali pentru inimile de hamsteri normali şi cardiomiopatici**

Parametri	Control	Cardiomiopatie	
Cr totala µmol/g d.w.	50.5 ± 3.8 (n=4)	28.2 ± 1.2 (n=7)	P<0.001

Scanned with OKEN Scanner

PcR, µmol/g d.w.	26.2 ± 2.16 (n=4)	16.7 ± 1.14 (n=7)	P<0.01
ATP, µmol/g d.w.	26.7 ± 1.83 (n=4	17.6 ±1.39 (n=7)	P<0.01
FLUX PCr ATP, µmol/g d.w*sec.	21.5 ± 3.07 (n=5)	11.14 ± 1.52 (n=6)	P<0.01
Activitatea CrK totala UI/g d.w.	4017 ± 67 (n=5)	2490 ± 193 (n=6)	
Activitatea CrK/Fluxµmol/IU*sec (*10^{-3})	5.35 ± 0.85 (n=5)	4.47 ± 0.96 (n=6)	N.S.
Presiunea sistolică mm Hg	115 ± 18 (n=4)	75 ± 13 (n=5)	P<0.05
PTDmm Hg	15 ± 1 (n=4)	13 ± 1 (n=5)	N.S.
AV BPM	94.20 ± 17 (n=4)	76.2 ± 7.2 (n=5)	N.S.
PRPm Hg/min	9120 ± 1200 (n=4)	4860 ± 1320 (n=5)	P<0.05

Această diferență nu a fost, totuşi, semnificativă din punct de vedere statistic. În concordanță cu schimbările parametrilor energetici celulari, indexul cardiac s-a redus cu aproape 50%

Scanned with OKEN Scanner

în inimile miopatice, ceea ce arată o clară insuficiență cardiacă.

Activitatea creatinchinazei totale în inimile miopatice a fost de 62% din cea a inimilor de control, exact ca aceea a conținutului tisular de citocromi aa_3. În mitocondriile izolate, totuşi, nu a existat o diferență în conținutul de citocromi aa_3 (*Tabelul* 4). Prin urmare, inimile miopatice au avut un conținut mitocondrial scăzut.

***Tabel* 4. Caracteristicile mitocondriilor şi ale sistemului creatinchinazei în inimile normale şi patologice**

	CrK totală UI/ g. w. w.	CrK mit Mg/g. w. w.	Cit. aa_3 µmol/g.w.w.	CrK mit mg/µmol cit. aa_3
Control 3.73 ± 0.11	803.5 ± 13	0.8 ± 0.03	19.1 ± 0.17	0.042 ± 0.002
Miopatie 4.5 ± 0.2	498 ± 38	0.38 ± 0.02	11.97 ± 1.54	0.032 ± 0.002

Dintre caracteristicile mitocondriilor izolate, numai activitatea creatinchinazei a fost cu 40% mai scăzută în mitocondriile din inima cardiomiopatică, în raport cu aceea din inima de control, pe când alți parametri – respirația *ADP*-dependentă, indexul de control respirator şi de asemenea activitatea specifică a creatinchinazei – nu au fost diferiți (*Tabelul* 5).

Scanned with OKEN Scanner

Tabel 5. **Parametrii mitocondriali izolați din inimile hamsterilor normali şi cardiomipatici**

Activitatea CrK UI/mg mit. protein	Activitatea CrK UI/ mgenzime	Cit. aa_3 µmol/mg mit. protein	Vo ng-atomi	V_3 0_2/min/mg	RCI mit. protein
Control 2.67 ± 0.07	199 ± 6	0.320 ± 0.01	43.5 ± 2.9	430 ± 15	7.4 ± 0.4
Miopatie 1.74 ± 0.01	174 ± 2	0.314 ± 0.005	42.7 ± 2.2	387 ± 25	6.65 ± 0.4

Determinarea directă a imunoenzimelor, descrisă anterior [425], a arătat o scădere a cifrei creatinchinazei mitocondriale în homogenații tisulari: in inimile cardiomiopatice cuantumul de izoenzime mitocondriale al creatinchinazei şi raportul său cu conținutul de citocrom aa_3 au fost, din punct de vedere statistic, semnificativ mai joase decât în inimile de control (vezi şi Tabelul 2).

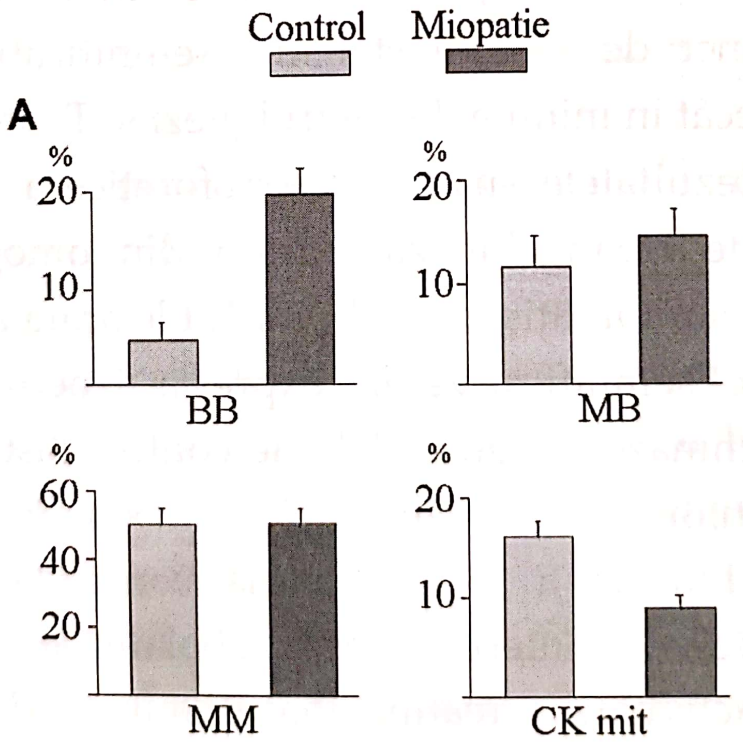
Rezultatele analizei electroforetice a fracției totale de creatinchinază extrasă din omogenații tisulari, sunt înfățişate în *Figura* 1. Ele arată alterări puternic semnificative în expresia izoenzimelor creatinchinazei: la animalele de control distribuția activităților între diferitele izoenzime ale creatinchinazei a fost în bună concordanță cu datele descrise anterior pentru şobolani sau iepuri.

Activitatea creatinchinazei mitocondriale a constituit 33% din activitatea creatinchinazei totale

Scanned with OKEN Scanner

[333]. La animalele miopatice, conținutul relativ al creatinchinazei mitocondriale a fost diminuat la jumătate, dar cel al *BB* a fost mărit de 4 ori (*Figura* 1A). Date similare au fost obținute pentru inimile umane (vezi mai jos, *Figura* 1Bşi paragraful următor).

Scăderea activității relative a creatinchinazei mitocondriale a fost dată de o reducere a cuantumului acestei proteine în mitocondrii, aşa cum s-a evidențiat direct prin *RIA*, şi diminuarea raportului dintre creatinchinază şi citocromul aa_3 [425]. Astfel, miopatia a rezultat într-o descreştere a activității creatinchinazei şi alterarea expresiei izoenzimelor sale.



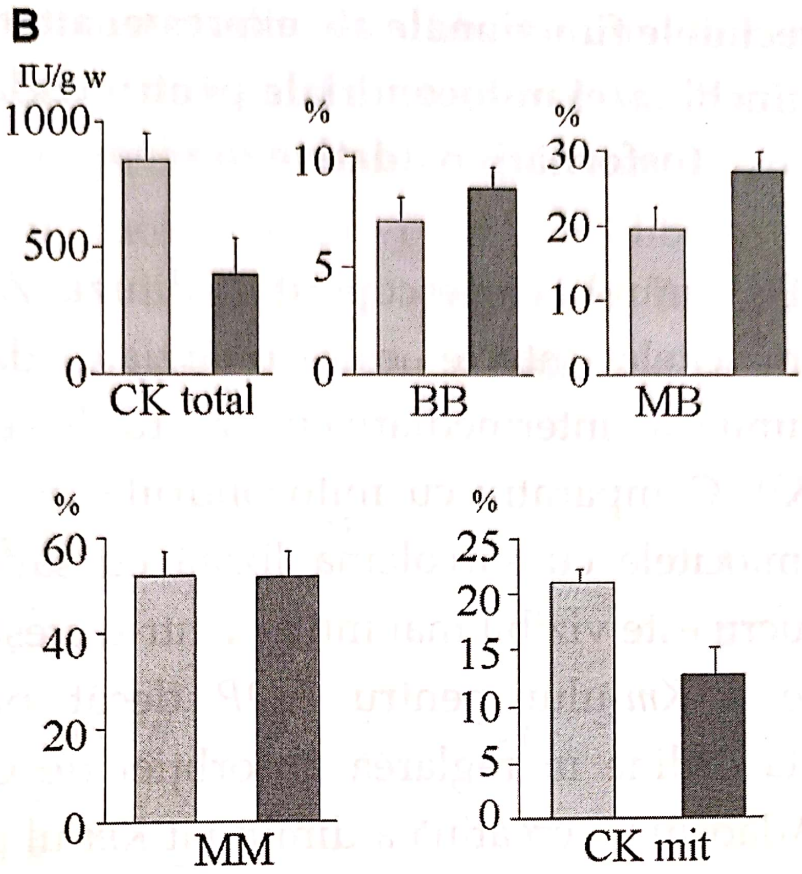


Figura 17. **(A) Alterări în spectrul izoenzimelor creatinchinazei la hamsteri cardiomiopatici. Sunt arătate procentajele diferitelor izoenzime în activitatea totală a creatinchinazei celulare. Spectrul izoenzimelor a fost determinat printr-o metodă de electroforeză cantitativă. (B) Schimbări în activitatea totală a creatinchinazei şi în diferitele sale izoenzime (arătate în procente ale activității totale) în inimi umane cardiomiopatice. Mostra de control a fost luată dintr-o inimă donată, preparată pentru transplant; a fost analizată inima miopatică a unui pacient bărbat de 37 de ani, cu diagnosticul de cardiomiopatie dilatativă clasa funcțională II.**

Scanned with OKEN Scanner

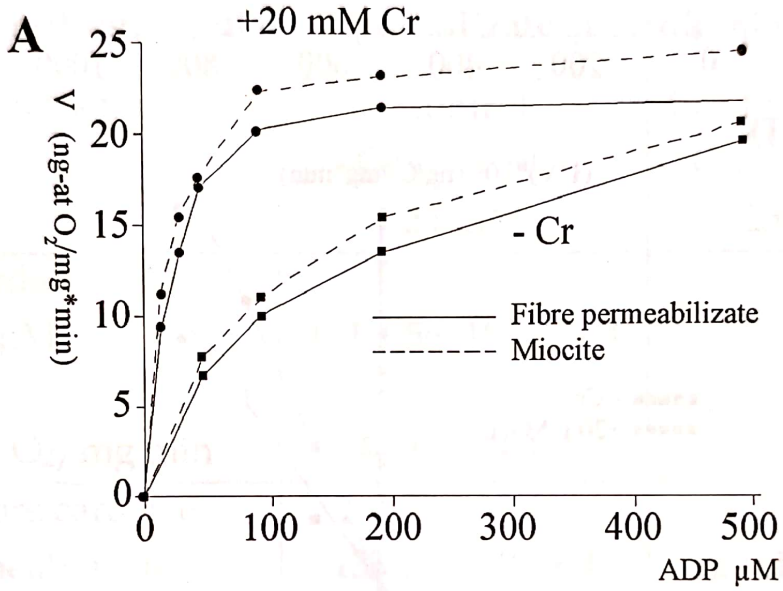
Consecințele funcționale ale expresiei alterate a creatinchinazei mitocondriale pentru reglarea fosforilării oxidative *in vivo*

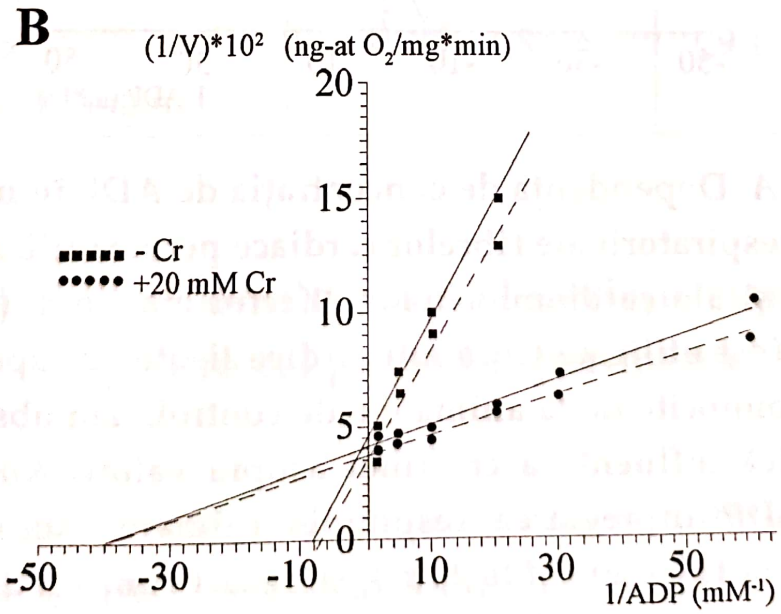
De curând am descoperit că difuzia *ADP* în cardiomiocitele intacte este întârziată datorită conexiunii sale intermediare cu structurile celulare [29, 333]. Comparativ cu mitocondriile isolate, în cardiomiocitele cu sarcolema lizată cu saponină, acest lucru este vizibil mai mult printr-o creştere în valoare a *Km*-ului pentru *ADP* decât printr-o anumită ordine în reglarea absorbției de O_2 [29, 333]. Adaosul de creatină a diminuat *Km*-ul pentru *ADP* de la 250 μM la 36 μM, datorită activării reacției creatinchinazei mitocondriale, cuplate cu fosforilarea oxidativă. Acest sistem cuplat amplifică eficient fluxul slab de *ADP* la concentrația sa redusă din mediu. Rezultatele obținute demonstrează poziția cheie ocupată de creatinchinaza mitocondrială în procesele de reglare *in vivo* a fosforilării oxidative.

Întrucât conținutul creatinchinazei mitocondriale este scăzut în inimile cardiomiopatice, putem preconiza că aceasta va rezulta într-o eficiență diminuată a reglării fosforilării oxidative, iar efectul creatinei asupra valorii *Km*-ului pentru *ADP* va fi diminuat. Este exact situația pe care am observat-o în lucrarea de față.

Scanned with OKEN Scanner

În acest studiu am utilizat inimi de hamsteri din al căror endocard au fost izolate fibre şi apoi lizate cu saponină – sau cardiomiocite, izolate şi tratate în mod similar, pentru a elibera enzime intracelular solubile şi pentru a face mediul intracelular compatibil cu substratele din mediu [450].





Scanned with OKEN Scanner

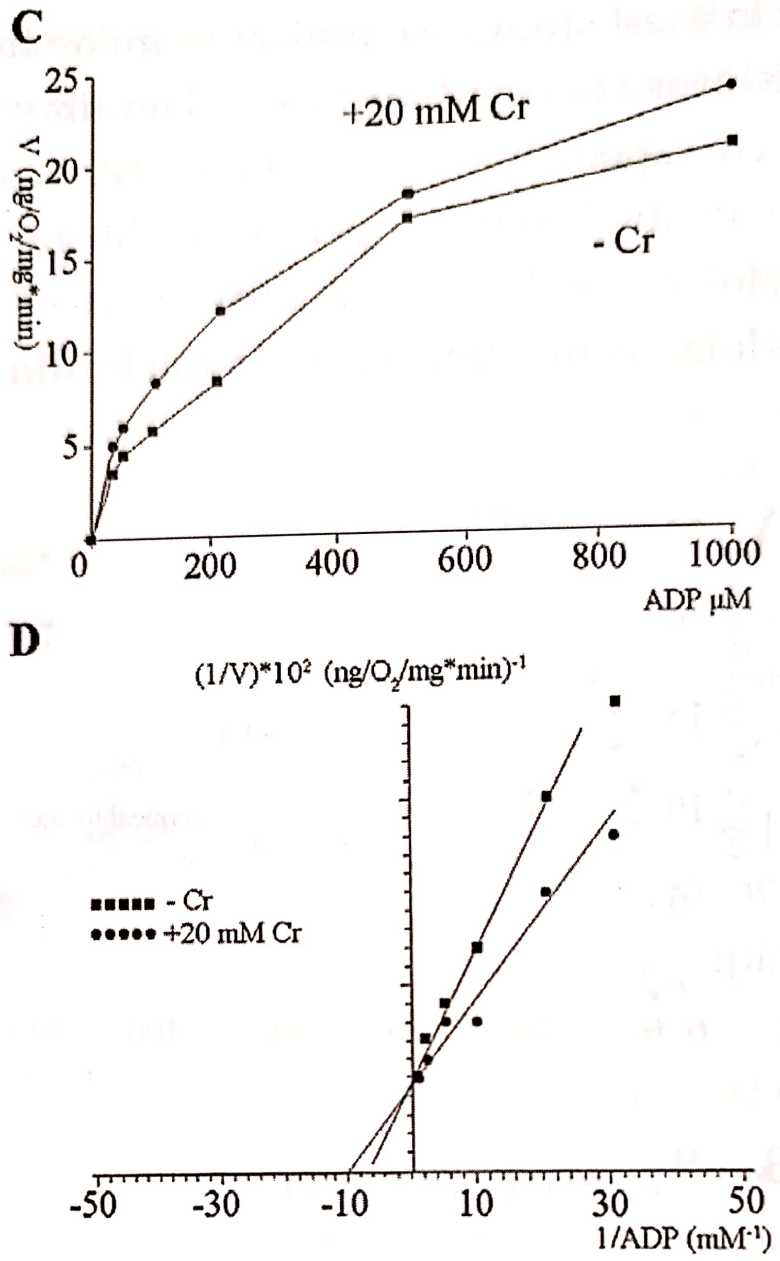


Figura 18 A. **Dependența de concentrația de ADP în mediu a ratelor respiratorii ale fibrelor cardiace permeabilizate cu saponină şi ale cardiomiocitelor. Efectul creatinei. (A, B) Când au fost utilizate fibre miocardice lizate cu saponină sau cardiomiocite de la animalele de control, am observat o puternică influență a creatinei asupra valorii *Km*-ului pentru *ADP* în reglarea respirației celulare. Aceasta a scăzut de la 133 ± 20 *µM* la 20 ± 4 *µM*, exact cum am descris anterior pentru inima de şobolan (*Figura* 2A).**

hamsteri normali. Liniile continue – fibre cardiace permeabilizate; liniile punctate: cardiomiocite izolate şi permeabilizate.

Figura 18 B. **(C, D) Hamsteri cardomiopatici. Sunt arătate rezultatele pentru fibrele cardiace permeabilizate. (A, C) Dependențe experimentale: (B, D) Reprezentarea graficelor lor dublu-reciproce.**

Tabelul 6. **Parametrii cinetici ai respirației mitocondriale în fibrele cardiace saponinlizate şi cardiomiocite**

Parametri	Control		Cardiomiopatie	
	-Cr	+Cr, 25 mM	-Cr,	+Cr, 25 mM
1.Cardiomiocite				
Km, μM	161 ± 56	19.5 ± 1.4	-	
Vmax, ng at O_2/mg min	44 ± 3	34 ± 9	-	
2. Fibre cardiace permeabilizate				
Km, μM	133 ± 20	20 ± 4	120±16	81±13
Vmax ng at O_2/mg min	31 ± 7	28 ± 6	29 ± 8	26 ± 5

Sunt date valorile medii şi deviația standard pentru cel puțin 3 experimente

În fibrele cardiace lizate cu saponină, izolate de la şoarecii cardiomiopatici *Km* pentru *ADP*, reglarea fosforilării oxidative a fost apropiată de cea a hamsterilor de control, cu o absență de

Scanned with OKEN Scanner

creatină (Fig. 2C & 2D). Totuşi, efectul creatinei a fost mult mai redus şi *Km*-ul pentru *ADP* în prezența a 25 *mM* de creatină a scăzut numai până la 81 *μM* (*Figura* 2B).

Astfel, deficiența în creatinchinaza mitocondrială are ca rezultat un deficit în reglarea efectivă *in vivo* a fosforilării oxidative şi în facilitarea difuziei întârziate a *ADP*-ului în celule. Rezultatele clinice prezentate în paragraful următor demonstrează că aceste schimbări intracelulare sunt corelate cu modificările a diverşi parametri importanți ai hemodinamicii centrale.

4.2. CARDIOMIOPATIA DILATATIVĂ

Cardiomiopatiile sunt boli ale muşchiului inimii caracterizate prin dimensiuni anormale ale cavităților şi grosimii peretelui sau anomalii ale funcției contractile cu precădere disfuncții sistolice sau diastolice, în absența bolii coronariene, a hipertensiunii arteriale, a unei boli valvulare sau a unei boli de inimă congenitale [101].

Cardiomiopatiile pot fi primare sau secundare. Cele primare constau din tulburări exclusiv sau predominant limitate la muşchiul inimii, de cauze genetice, non-genetice sau dobândite. Cardiomiopatiile primare dobândite

Scanned with OKEN Scanner

pot fi urmare a bolilor inflamatorii, cum ar fi miocardita, boala provocată de stres (Taku-tsobo), consecința stării de peripartum [150], sau indusă de tahicardie. Cardiomiopatiile secundare sunt tulburări care implică leziuni miocardice în urma unor boli sistemice sau multiorgan [253]; cu toate acestea, pentru diagnosticul cardiomiopatiei dilatative, gradul de disfuncție miocardică nu poate fi explicat exclusiv prin încărcarea anormală sau afectarea ischemică [316].

Cardiomiopatia dilatativă este cea mai comună cardiomiopatie în întreaga lume și este asociată cu moartea cardiacă subită şi insuficiență cardiacă, presupunând costuri ridicate, din cauza ratei foarte mari de spitalizare și necesitatea potențială de transplant de inimă.

Grupul cardiomiopatiilor reprezintă, probabil, cel mai eterogen grup de boli, iar încercarea de a le clasifica s-a dovedit de-a lungul timpului o întreprindere extrem de laborioasă şi, în multe situații, confuză.

Prima clasificare a cardiomiopatiilor datează din 1980, când în definiția cardiomiopatiilor intrau numai „bolile miocardice de cauză necunoscută". Aceasta a fost urmată de clasificarea OMS din 1995, cea mai recentă, până de curând, ce numeşte cardiomiopatiile „boli miocardice asociate cu disfuncție cardiacă" şi include noi categorii,

Scanned with OKEN Scanner

precum cardiomiopatia restrictivă primară şi displazia aritmogenă de ventricul drept. Non-compactarea ventriculului stâng a fost anterior considerată o boală rară, şi a fost identificată sub diferite nume-*miocard spongios, miocard fetal*şi *non-compactare ventriculară stângă* [303]. Se consideră că anomalia reprezintă o oprire în procesul normal de compactare miocardică, stadiu final al morfogenezei miocardice, având ca rezultat persistența mai multor trabecule ventriculare proeminente şi profunde adâncituri intertrabeculare. Cu revizuirea atentă a ecocardiogramei şi a altor date clinice, această tulburare pare a fi frecventă la copii, şi este, de asemenea, raportată la adulți [295]. Aproximativ 9% din toate cazurile de cardiomiopatie sunt diagnosticate ca non-compactare ventriculară stângă, doar cardiomiopatia dilatativă şi cardiomiopatia hipertrofică fiind mai frecvente. În cea mai recentă clasificare a cardiomiopatiilor elaborată de Colegiul American de Cardiologie / American Heart Association (AHA / ACC) non-compactarea ventriculară stângă a fost recunoscută pentru prima dată ca o formă oficială de cardiomiopatie [388]. Un procent substanțial dintre pacienți au ventriculul stâng dilatat cu disfuncție sistolică, imitând cardiomiopatia dilatativă. Semnele, simptomele şi rezultatele acestor pacienți

Scanned with OKEN Scanner

sunt comparabile cu cele de la pacienții cu cardiomiopatie dilatativă esențială, dar la bebeluşi consecințele sunt mai grave decât pentru cei cu cardiomiopatie dilatativă.

Progresul considerabil din ultimii ani din domeniile geneticii şi biologiei moleculare în cardiologie, dar şi al imagisticii medicale a determinat identificarea unor entități noi, prin înțelegerea mai bună a mecanismelor şi cauzelor. Aceasta a făcut ca vechea definiție şi clasificare să devină incompletă şi, uneori, inexactă şi a constituit punctul de plecare pentru reconsiderarea terminologiei folosite şi completarea vechii clasificări.

În noua abordare, cardiomiopatiile sunt definite ca un grup eterogen de boli ale miocardului, asociate cu disfuncție mecanică şi/sau electrică, ce se pot însoți de hipertrofie şi/sau dilatație, având variate cauze cunoscute, ce pot fi de multe ori genetice. În acelaşi timp, definiția cardiomiopatiilor cuprinde şi precizarea că afectarea miocardică poate fi generată şi limitată strict la nivelul cordului, dar,în egală măsură, poate fi şi manifestarea unor afecțiuni sistemice. Evoluția, în ambele situații, se constată, în general, către insuficiență cardiacă sau moarte cardiovasculară, având ca element comun alterarea performanței miocardice.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește clasificarea propusă de Societatea Americană (AHA) în 2006 și reluată și comentată de Societatea Europeană de Cardiologie (ESC) în 2008, cardiomiopatiile sunt împărțite în două mari grupe: a) *primare*, ce pot fi la rândul lor genetice, mixte (genetice și nongenetice), dobândite și b) *secundare* – cu interesare miocardică în cadrul unor afecțiuni extrem de variate, multiorganice (înainte denumite „boli specifice miocardice"). Actuala clasificare are la bază în mod special cunoașterea prezentă, mult mai bună, a biologiei moleculare și a mutațiilor genetice de la nivelul proteinelor miocardice (multe dintre cardiomiopatii sunt cunoscute acum ca fiind familiale) [253]. Cunoștințele despre fondul genetic care stau la baza acestor boli se dovedesc, în anumite cazuri, a fi foarte utile – atât în diagnostic cât și în tratament, oferind posibilitatea de diagnostic precoce și sporind astfel șansele terapiei de succes. Este totodată dificil de găsit cauza genetică a tulburărilor multigenice, cum ar fi cardiomiopatia dilatativă, mai ales în cazul în care se consideră că mutațiile în genom formează doar unul dintre factorii care contribuie la această boală. De aceea, înșiși autorii consideră că o clasificare exclusiv genetică este prematură și, deci, nerecomandabilă atâta vreme cât genetica

Scanned with OKEN Scanner

moleculară şi relația genotip-fenotip sunt, încă, incomplet cunoscute.

În continuare, vom limita obiectul investigațiilor noastre, axându-ne pe cercetarea **cardiomiopatiei dilatative**, vom analiza diversele ei forme de manifestare, cu precădere, la nivel instrumental, morfologic şi molecular-celular, facilitând, astfel, situarea lucrării noastre în contextul căreia îi aparține şi vom încerca să obținem o viziune de ansamblu asupra problemei.

Boală cronică a miocardului, cardiomiopatia dilatativă evoluează dificil, din cauza caracterului vag al etiologiei şi patogeniei, a similitudinilor modificărilor macromorfologice şi a manifestărilor clinice cu alte entități nozologice ale inimii. CMD se caracterizează prin lărgirea difuză, evolutivă, de cele mai multe ori fără legătură cu factorul etiologic, a tuturor cavităților inimii, prin scăderea contractilității miocardului,fracția de ejecție a ventriculului stâng mai mică de 50%, fracția de scurtare mai mică de 25-30%, care debutează, de obicei, după o boală infecțioasă. Este, de regulă, asociată cu insuficiență cardiacă, aritmii și/sau tulburări de conducere și boală tromboembolică, dar poate fi, de asemenea, asimptomatică. Constituie una dintre cele mai comune cauze ale insuficienței cardiace, ducând la un procent considerabil de morbiditate și mortalitate. Această

Scanned with OKEN Scanner

afecțiune se dezvoltă la orice vârstă, la ambele sexe, la persoanele de orice origine etnică [297, 299 - 301].

Prevalența de cardiomiopatie dilatativă este un caz din 2500 de pacienți, cu o incidență de 7/100 000/an şi este de 3 ori mai frecventă la pacienții de culoare şi bărbați, decât la albi şi femei (Bender *et al.*, 2011, Hershberger și colab., 2007, Taylor și colab., 2006), la copiii mai mici de 1 an decât la alți copii (4- 40 vs 0- 34 de cazuri la 100.000). CMD poate apărea sporadic la un singur membru al familiei și atunci este numită CMD idiopatică (CMI). Două treimi dintre copii sunt considerați a avea boală idiopatică. Cardiomiopatia dilatativă poate fi, de asemenea, moștenită și termenul utilizat este in acest caz CMD familială (FCD), reprezentând 20-48% din cazurile de CMD. Conform Mestroni și colab. (1999), diagnosticul de FCD este stabilit în prezența a două sau mai multe persoane afectate într-o singură familie sau în prezența unei rude de gradul întâi a unui pacient CMD cu moarte subită bine documentată, înaintea vârstei de 35 ani.

Prognosticul de viață, la CMD,este extrem de nefavorabil. După spitalizarea primară, [53] durata de viață nu depăşeşte 13,5 ani, în plus, în primul an şi jumătate, decedează 40% dintre bolnavi, iar letalitatea de 50 % vizează 3 ani.

Scanned with OKEN Scanner

Sunt identificați mai mulți **predictori** *(sumari)* de prognostic nefavorabil *(aritmiile ventriculare maligne, disfuncțiile ventriculare severe, galopul protodiastolic)*. Un important predictor, cu valoare incontestabilă de prognostic rezervat, luat în considerare la stabilirea indicației în transplantul de cord este reducerea, până la mai puțin de 10 ml/kg/min, a capacității maximale de utilizare periferică a oxigenului în timpul testului de efort.

Indicii clinico-instrumentali cei mai semnificativi, ce influențează negativ prognosticul de viață al bolnavilor cu CMD, după rezultatele analizei-plurifactor a variabilelor independente, efectuate de noi, sunt [53]:

- *vârsta la apariția primelor simptome de boală mai mică de 33 de ani*
- *prezența, în momentul spitalizării primare, a IC CF III-IV*
- *debutul bolii cu sindrom cardialgic şi/sau tromboembolic*
- *prezența fracției de ejecție mai mică de 28%*
- *frecvența lambourilor de tahicardii ventriculare şi a dubletelor ventriculare peste 11 în 24 de ore*
- *tensiunea arterială sistolică mai mică de 115 mmHg*

Scanned with OKEN Scanner

Prezența, la bolnavi, a 4 sau 5 factori nefavorabili, indică, practic, o probabilitate de 100% a sfârşitului letal, în curs de 3 ani după spitalizarea primară.

Analiza computerizată a curbelor de rămânere în viață [53] permite detaşarea a 6 variante de evoluție clinică a CMD, bazate pe manifestările clinice precoce ale bolii:

- 1. *debutul bolii cu o infecție respiratorie virală – 37%*
- 2. *debutul bolii cu tahiaritmii supraventriculare – 20,4%*
- 3. *debutul bolii cu sindrom cardialgic – 17,0%*
- 4. *debutul bolii cu sindrom tromboembolic – 10,1%*
- 5. *debutul bolii cu o infecție respiratorie virală, asociată cu o tulburare de ritm cardiac – 5,9%*
- 6. *cauza bolii n-a fost stabilită – 9,6%*

S-a apreciat că aproximativ un sfert din insuficiența cardiacă este determinată de CMD. Astfel, cardiomiopatia dilatativă are o **incidență** de **7-8‰**cazuri şi produce anual 10.000 de decese şi

Scanned with OKEN Scanner

peste 45.000 de internări, vârsta medie fiind de 45 de ani, iar 75% din bolnavi sunt bărbați.

Cauzele cardiomiopatiei dilatative (primare familiale și genetice) În multe cazuri, după cum am menționat supra, boala este moștenită, cunoscută sub noțiunea de cardiomiopatie dilatativă familială. Asocierea familială este semnificativă, între 20-48% [382] dintre pacienți având rude de gradul I şi II cu CMD probabilă sau definită *(incidența este subestimată din cauza imposibilității de a evidenția prezența bolii doar pe criterii clinice şi morfologice şi a lipsei unor markeri precoce de boală)*. Majoritatea cazurilor *(60%)* sunt cu transmisie autosomal dominantă. Există însă şi transmitere autosomal recesivă *(16%)* sau X-lincată *(10%)*.

Fenotipic se disting 5 tipuri:

- *CMD* cu distrofie musculară
- *CMD* juvenilă cu evoluție rapidă *(preponderent la bărbați)*
- *CMD* cu hipochinezie segmentară a VS
- *CMD* asociată cu tulburări de conducere
- *CMD* asociată cu surditate senzorineurală

Cardiomiopatia dilatativă moștenită a fost considerată ca implicând un procent mic de cazuri până când Michels și colaboratorii [259] au arătat,

Scanned with OKEN Scanner

realizând screeninguri de familie, că aproximativ 20% din subiecți au avut membri ai familiei cu dovezi ecocardiografice ale acestei boli. Cardiomiopatia dilatativă familială se dezvoltă în 30-48% din cazuri [386], cu moştenire dominant-autozomală ca model predominant de transmitere (conexiune-X), recesiv-autozomală, și moștenire mitocondrială, ultimele mai puțin frecvente decât dominant-autozomală. O istorie de familie și a arborelui genealogic ar trebui efectuate pentru a analiza în continuare un posibil mod de transmitere genetică. Trebuie avut în vedere screening-ul rudelor de gradul întâi [149].Gene cauzatoare de cardiomiopatie dilatativă par a codifica predominant două subgrupe majore de proteine – proteine citoscheletice și sarcomerice [386, 385, 47, 390]. Proteinele citoscheletice identificate până în prezent includ distrofina, [111, 83] desmina, [383] lamina A/C, [384] δ-sarcoglican, [391] β-sarcoglican, [26] și metavinculin [285]. În cazul genelor care codifică sarcomerul, par a fi responsabile aceleași gene identificate pentru cardiomiopatia hipertrofică, inclusiv lanțul greuβ-miozină, proteina Cligatoare de miozină, actina, α-tropomiozina și troponina T și C [28, 71, 174, 177]. În plus, a fost identificat un nou grup de gene sarcomerice, cele care codifică proteine discului-Z, 36-ZASP, [397] proteina LIM- musculară (lin-11,

Scanned with OKEN Scanner

ISL-1, și mec-3),α-actinin-2, [264] miopalidin [96], proteina cardiacă ankirin repetitivă [273] și teletonină [144]. De asemenea, au fost raportate și fosfolamban [357], tafazin [39] și gena canal-sodiu SCN5A44.

Testarea genetică pentru boli cardiovasculare este pe cale de a deveni comună, multe laboratoare din lume făcând testări curente. Pentru cardiomiopatia hipertrofică, randamentul diagnosticării la testare este de 60-70%; Totuși, testarea pentru cardiomiopatie dilatativă are un randament mult mai mic de 60%. Gena cel mai frecvent identificată este lamin A/C, dar numai atunci când boala este asociată cu bloc atrioventricular (cu sau fără miopatia scheletică). În cardiomiopatia dilatativă esențială, randamentul screening-ului pentru un număr mare de gene este de aproximativ 20%. Genele cel mai frecvent identificate sunt gena TAZ a sindromului Barth, ZASP, desmina, și la bărbați, distrofina.

În privința cardiomiopatiei dilatative în formele X-lincate, două tulburări au fost bine caracterizate – cardiomiopatia dilatativă X-lincată, prezentă în adolescență și la tinerii adulți, și sindromul Barth, care este cel mai frecvent identificat la sugari si copii [31]. În 1987, Berko și Swift [31] au descris pentru prima cardiomipatie

Scanned with OKEN Scanner

dilatativă X-lincată ca și cardiomiopatie dilatativă care se dezvoltă la tineri în anii adolescenței și înainte de 20 de ani, cu progresie rapidă de la insuficiență cardiacă la moarte, atribuită tahicardiei sau insuficienței ventriculare, dacă nu se intervine cu transplant. La aceşti pacienți sunt identificate cantități ridicate ale izoenzimei creatinkinazei musculare în ser. Femeile au tendința de a dezvolta cardiomiopatie dilatativă uşoară până la moderată în al cincilea deceniu, cu progresie lentă. Towbin şi colegii săi [387] au fost primii care au identificat gena cauzatoare de boli și au caracterizat defectul funcțional conform căruia gena distrofin s-a dovedit a fi responsabilă de valori clinice anormale [274]. Analiza proteinei prin immunoblotting a indicat o reducere severă sau lipsa proteinelor distrofin in inimă. Aceste rezultate au fost confirmate ulterior de Muntoni și colaboratori [274] când o mutație în muşchiul promotor și exonul 1 al distrofinei au fost identificate într-o altă familie cu cardiomiopatie X-lincată [274]. Ulterior, multe mutații ale distrofinei au fost identificate la pacienții cu această boală.

Gena distrofin, atunci când e mutantă, este de asemenea responsabilă pentru distrofia musculară Duchenne şi Becker; aceste miopatii scheletice apar foarte devreme în viață. Băieții cu

Scanned with OKEN Scanner

distrofie musculară Duchenne sunt imobilizați înainte de vârsta de 12 ani, în timp ce distrofia musculară Becker este o boală a mușchiului mai uşoară decât distrofia musculară Duchenne, în care acestea se pot deplasa și după vârsta de 16 ani, deşi această prognoză a fost modificată de tratamentele din stadii incipiente cu doze mari de steroizi [83, 257]. Aproape toți acești pacienți dezvoltă cardiomiopatie dilatativă înainte de vârsta de 21 de ani. În cele mai multe cazuri, izoforma musculară a creatinkinazei din ser este la un nivel ridicat, similar cu cel din cardiomiopatia X-lincată. Femeile dezvoltă boala mai târziu, la fel cu pacienții prezentând cardiomiopatie X-lincată. Mai mult, analiza imunohistochimică arată concentrații reduse (sau lipsă) de distrofină, similare cu datele pacienților cu cardiomiopatie X-lincată. Informațiile obținute din studii pe cardiomiopatie X-lincată și distrofie musculară Duchenne şi Becker [47, 385, 390] au condus la supoziția că cardiomiopatia dilatativă este o boală a citoscheletonului și a sarcolemei care afectează sarcomerul – calea finală comună a cardiomiopatiei dilatative. Constatările, conform cărora trei din 22 de băieți cu cardiomiopatie dilatativă idiopatică au avut mutații ale distrofinei și valori ridicate ale izoenzimei creatinkinazei musculare în ser, vin in sprijinul ideii[320] arătând

Scanned with OKEN Scanner

că mutațiile distrofinei joacă un anume rol in cardiomiopatia dilatativă idiopatică la indivizii de sex bărbătesc.

Sindromul Barth, descris inițial ca miopatie cardioscheletică X-lincată cu mitocondrii anormale și neutropenie, de obicei apare la bebelușii de sex bărbătesc ca o insuficiență cardiacă asociată cu neutropenie (ciclic) și acidurie 3-metilglutaconică [27]. Disfuncția mitocondrială apare la microscopia electronică si la analizele biochimice ale lanțului de transport al electronilor. Rezultate anormale ale cardiolipinei sunt cruciale în evoluția bolii [156]. Baza genetică a sindromul Barth o constituie anumite mutații ale genei tafazin (TAZ), care codifică proteina tafazin, o acyltransferază [39] Mutațiile în TAZ apar într-o gamă largă de rezultate, inclusiv în cardiomiopatia dilatativă, cardiomiopatia dilatativă hipertrofică, fibroelastoza endocardului sau non-compactarea ventriculului stâng [386, 389]. Aritmiile sunt, de asemenea, frecvente la aceşti pacienți, şi clinic boala este de obicei asociată cu simptome de insuficiență cardiacă, sincopă sau moarte subită, acidoză, sau complicații infecțioase [372].

Canalele ionice în inimă sunt esențiale pentru funcționarea electrofiziologică normală a inimii. Disfuncția lor conduce la tulburări de ritm, cum ar fi sindromul QT lung, sindromul Brugada,

Scanned with OKEN Scanner

tahicardia ventriculară polimorfă catecholaminergică, fibrilația atrială, și blocul atrioventricular [348]. Această cale finală, comună pentru aritmii, joacă de asemenea un rol important în comportamentul clinic al inimii în cardiomiopatia dilatativă. Multe canale ionice par a interacționa cu proteinele sarcomerice şi sarcolemale, aceste relații punând în pericol ritmul cardiac. O altă genă homeostazică a canalelor ionice asociată cu cardiomiopatia dilatativă este fosfolambanul, care are un rol în homeostaza calciului. Importanța acestor proteine în tabloul clinic al acestei boli a fost demonstrată prin includerea lor în schema de clasificare a Asociației Americane a Inimii [388] și în raportul workshopului Institutului Național al Sănătății [218].

Mecanismele asociate cauzelor bolii sunt generate de defectele de generare şi transmitere a forței, de anomaliile mecanosenzoriale si metabolice, și homeostaza anormală a calciului [7, 21]. Cele mai multe gene identificate până în prezent codifică fie proteinele citoscheletice, fie sarcomerice. Pentru proteinele citoscheletice, se crede că defecte de transmitere a forțelor rezultă în fenotipul cardiomiopatiei dilatative, în timp ce defectele de generare a forțelor au fost puse în legătură cu producerea cardiomiopatiei dilatative induse de proteinele sarcomerice. Cu toate acestea,

Scanned with OKEN Scanner

mutațiile sarcomerilor duc frecvent la un fenotip clinic, din cauza defectelor de transmisie a forței [71, 158, 224].

Mutațiile in sarcomeri pot produce cardiomiopatie hipertrofică sau cardiomiopatie dilatativă. În cazurile de cardiomiopatie dilatativă, anomaliile în generarea sau transmiterea forței sunt considerate ca având o contribuție la dezvoltarea acestui fenotip. În afară de mutațiile în proteina de filament subțire, actina, mutațiile din proteina de filament gros care codifică lanțul greu al genei β-miozină au cauzat cardiomiopatie dilatativă asociată cu moartea subită a cel puțin unuia dintre bebeluşi și cu cardiomiopatie dilatativă la copii și adulți. Mutațiile în această genă se presupune că perturbă interacțiunea actină-miozină și forța de generare sau modifică mişcarea punților transverse din timpul contracției. Mutațiile în troponina cardiacă T, o proteină filament subțire, ar putea întrerupe legarea troponinei C calciu-senzitivă [158]. Au fost identificate de asemenea mutații în fosfolamban care oferă în continuare suport în manipularea calciului, fiind un mecanism potențial important în dezvoltarea acestei tulburări. Haghihi și colab. [137] au identificat mutații homozigote care cauzează cardiomiopatie dilatativă și insuficiență cardiacă, remarcând că heterozigoții aveau

Scanned with OKEN Scanner

hipertrofie cardiacă [137]. Mutațiile recesive în troponina I pot afecta interacțiunea cu troponina T, [275] în timp ce au fost identificate mutații ale α-tropomiozinei care se presupune că au modificat sarcina superficială a proteinei, deteriorând interacțiunea cu actina [285].

O zonă de interes pentru evaluarea la nivel molecular este discul Z [189]. Knoll și colegii [189] au identificat mutați in proteinele musculare-LIM și au arătat că aceste mutații duc la defecte în interacțiunea cu teletonina [189]. În experimentele pe şoareci, au demonstrat de asemenea că proteina musculară-LIM acționează ca un senzor de întindere și că versiunile mutante ale acestei proteine provocă disfuncții în această activitate. În plus, Mohapatra şi colab. [264] au detectat mutații ale acestei proteine în familii, au descris cazuri sporadice, și au identificat rezultate anormale în sistemul tubulilor T și in arhitectura discului Z cu ajutorul microscopiei electronice, corespunzând histopatologiei observate în proteinele musculare LIM la şoarecii în knockout [189]. Descoperiri [443] procentual reduse de proteină musculară-LIM in insuficienta cardiacă cronică la om susțin teoriile lui Mohapatra şi ale colegilor. Pe lângă acestea, mutații în α-actinina 2, care are un rol în combinarea filamentelor de actină și deține în comun cu distrofina un domeniu ce leagă actina,

Scanned with OKEN Scanner

au fost, de asemenea, identificate în cardiomiopatia dilatativă familială, perturbând legarea α-actininei 2 de proteinele musculare-LIM.

Vatta și colab. [397] au identificat mutații în proteina Z-band alternativ îmbinată cu proteina PDZ-motrice (ZASP), omologul uman al genei cifrate la șoarece, ce duce la cardiomiopatie dilatativă când este distrusă [369]. Această proteină, care interacționează cuα-2 actinina, perturbă actina citoscheletică când suferă mutații. Genatitin, ce codifică proteina gigant citoscheletică sarcomerică, titin, contribuie la menținerea organizării sarcomerului și la elasticitatea miofibrilară, și interacționează cu aceste proteineîn zona disc Z / banda de tranziție I [130]. Mai mult, în cardiomiopatia dilatativă familială au fost identificate mutații [345]. Mutațiile in ANKRD1 provoacăatat cardiomiopatie dilatativă cât și cardiomiopatie hipertrofică, ceea ce susține ideea că genele de codificare a sarcomerului și a Z-discului pot avea fenotipuri variabile [20, 273]. Cardiomiopatia dilatativă asociată cu blocul atrioventricular sau miopatia scheletică,sau cu ambele, este cel mai frecvent asociată cu mutații în lamina nucleară A/C [298, 297]. Laminele sunt situate în lamina nucleară de pe partea nucleoplasmică a membranei nucleare interne, iar laminele A și C sunt evidente în inimă și mușchii

Scanned with OKEN Scanner

scheletului. Pentru prima dată a fost arătat faptul că mutațiile din această genă provoacă forma dominant autosomală a distrofiei musculare Emery-Dreifuss, [298] care presupune miopatie scheletică asociată cu cardiomiopatie dilatativă și disfuncția sistemului de transmitere. Aceste mutații provoacă, de asemenea, o formă dominant-autosomală de distrofie musculară la nivelul membrelor, asociată cu disfuncția sistemului de transmitere [298, 297]. Mecanismele responsabile pentru dezvoltarea acestei boli s-au dovedit a fi tulburările de sistem de transmitere și miopatia scheletică.

Cauzele infecțioase

Cauze infecțioase ale disfuncției ventriculare stângi concordante cu fenotipul cardiomiopatiei dilatative sunt comune, incluzând infecțiile virale, bacteriene, fungice, parazitare, rickettsiale și spirotricheale. În miocarditele virale, numeroşi patogeni virali cauzează disfuncții ale organismului uman. În trecut, diagnosticul cauzal depindea de cultura virală a unor mostre periferice (și rar țesut cardiac), precum și de testarea serologică de serie. În ultimii 15-20 de ani, testarea pe bază moleculară a țesutului miocardic a devenit

Scanned with OKEN Scanner

o utilă metodă de diagnostic, în special, analiza PCR a genomurilor virale din inimă. Cele mai comune virusuri identificate prin această metodă din mostre debiopsie subendomiocardică sunt parvovirusul B19, adenovirusul, virusul Coxsackie B și alte enterovirusuri, gripa A, virusul herpes uman 6, citomegalovirusul, virusul Epstein-Barr, virusul herpes simplex tip 1 și hepatita C. [49, 48].

1. Una dintre cauzele frecvente de evoluție a CMD (peste 40% din cazuri), depistată de noi [146] o reprezintă infecția respiratorie virală. În asemenea cazuri, CMD poate fi privită ca un sfârşit al miocarditei suferite.

Cauza virală predominantă a acestei boli pare să se schimbe la fiecare deceniu (coxsackievirus în anii 1980, adenovirus în anii 1990, și, începânddin 2000, parvovirusul B19). Prezentarea bolii poate varia, de la simptome minore de stare generală de rău la insuficiență cardiacă acută decompensată, cu dureri în piept și infarct miocardic, sau oprire cardiacă subită [102]. Utilizarea de eșantioane de biopsie subendomiocardică atunci când se suspectează o miocardită rămâne insuficientă, mai ales la copii. Cu toate acestea, s-au înregistrat progrese în diagnostic şi tratament pe baza utilizării acestei tehnici și, de asemenea,în urma studiilor de histologie și PCR. Utilizarea de tehnici non-

Scanned with OKEN Scanner

invazive, cum ar fi RMN-ul cardiac, constituie modalități de diagnostic eficiente și sunt mult mai utilizate decât au fost în trecut [116]. Cardiomiopatia Chagas, cauzată de protozorul *Trypanosoma cruzi*, rămâne principala cauză de insuficiență cardiacă sistolică cronică în zonele endemice [36]. Aceasta se caracterizează prin insuficiență cardiacă, boală tromboembolică, tulburări de conducere și aritmii maligne, moarte cardiacă subită.

O multitudine de **citochine proinflamatorii**, cum ar fi TNF_a, enzima de conversie *etc.*, are expresie patentă în *CMD* şi pare a juca un rol important în disfuncția contractilă. Concomitent cu decompensarea cardiacă se produce şi endotelina *(care contribuie la creşterea tonusului vascular)*. **Miocarditele** par a se transforma, printr-un mecanism imunologic, în CMD. Datele ce ajung să susțină acest enunț provin din elementele de biopsie subendomiocardică, care au identificat, inconstant, un infiltrat inflamator miocardic şi în cazul cercetărilor serologice şi de hibridizare *in situ*. Se estimează că mai bine de 20% din miocarditele virale au o evoluție către o cardiomiopatie dilatativă. Specificăm, însă, că date patente virusologice şi morfologice, vizând relația miocardită virală-CMD, lipsesc actualmente, iar rezultatele unor tehnici de înaltă performanță, cum

Scanned with OKEN Scanner

ar fi reacția de polimerizare în lanț, sunt contradictorii.

Miocardita este caracterizată de inflamarea patologică a miocardului, ceea ce duce la insuficientă cardiacă cronică la un număr substanțial de pacienți cu vârsta sub 40 de ani [413]. Diagnosticul pentru ambele cauze, virale și non-virale, se bazează pe criterii histologice, imunologice si imunohistochimice bine stabilite, pentru probele de biopsie subendomiocardică. Un subgrup de pacienți cu miocardită apărută din diverse cauze dezvoltă o formă cronică a bolii care poate fi virală, imună post-infecțioasă, sau a vreunui organ specific la indivizi predispuşi genetic [316, 235] Miocardita cronică autoimun-mediată este caracterizată de autoanticorpi la miozina cardiacă și alți antigeni ai inimii [226]. Rezultatele clinice si datele experimentale [227] sugerează că, dintre acești anticorpi, cei care sunt îndreptați împotriva receptorului adrenergic-β1 induc disfuncția cardiacă și cardiomiopatia, și pot modula severitatea bolii. Cu toate acestea, dacă pacienții dezvoltă boli de inimă, deoarece posedă anticorpi dăunători împotriva acestui receptor sau dacă dezvoltă aceşti anticorpi ca urmare a injuriei țesutului cardiac rămâne o ipoteză neclară.

Rezultatele altor studii au implicat şi alți autoanticorpi; cum ar fi un grup de autoanticorpi

Scanned with OKEN Scanner

împotriva proteinelor celulare cardiace, incluzând receptorii G-protein-legați, dar şi receptorul muscarinic cholinergic, miozina, proteinele mitocondriale (de exemplu, translocatorul adenin nucleotid şi dehidrogenaza ceto-acid), actina, tubulina, proteine de şoc termic, reticulul sarcoplasmic ATP-ază, miozina şi troponinele [63]. Aspectele clinice ale acestor autoanticorpi rămân însă neclare. Cu toate acestea, autoanticorpii cardiaci circulanți sunt identificați la pacienți cu cardiomiopatie dilatativă şi în miocardită cu o frecvență mai mare decât la pacienții cu boală cardiacă non-inflamatorie. Mai mult decât atât, la rudele sănătoase ale pacienților cu cardiomiopatie dilatativă, autoanticorpii anticardiaci din ser sunt un bun predictor independent pentru dezvoltarea acestei boli [62]. Atât aspectele înnăscute, cât şi adaptative ale sistemului imunitar ar putea avea un rol în influențarea rezultatelor, atât pentru animalele de laborator cât şi pentru pacienții cu miocardită virală [157].

Mecanismele genetice asociate cu miocardita autoimun-mediată rămân insuficient înțelese. Cele mai multe studii genetice pe oameni au sugerat o relație între antigenii MHC de clasa a II-a şi cardiomiopatia dilatativă [24]. Cu toate acestea, invocata relație, mai ales cu HLA-DRB4, a fost pusă în evidență la un mic grup de pacienți. Alte

Scanned with OKEN Scanner

studii [242] nu au susținut aceste rezultate. Astfel de discrepanțe raportate ar putea proveni din diferențele din istoricul pacienților, cum ar fi originea etnică [381]. Date recente pe observații privind un șoarece modelnon-obez diabetic care dezvoltă o miocardită spontană sugerează, de asemenea, un posibil rol al genelor legate de sex. Rolul MHC clasa I în miocardita autoimună la animale sau la oameni nu a fost bine stabilit. Potențiale mutații specifice anumitor gene care cauzează miocardita autoimună au fost investigate, dar rareori definite. Bolile autoimune, ca diabetul și lupusul eritematos sistemic, au loci cu miocardită suprapuși, sugerând trăsături genetice comune. Această constatare ar putea explica susceptibilitatea la miocardita autoimună printre diferitele populații. Miocardul afectat de insuficiență produce de asemenea semnale care ajută la infiltrarea leucocitelor prin suprareglare sau prin secreția de molecule de adeziune celulară. Endoteliul din microvascularizația inimii cu insuficiență crește procentul acestor molecule, cum ar fi P-selectina, e-selectina, molecula de adeziune intracelulară 1 și molecula vasculară de adeziune celulară 1, ceea ce permite migrarea transendotelială a unui număr de celule imune în miocard, incluzând celule B, celule T, celule natural killer, monocite și trombocite [161, 424].

Scanned with OKEN Scanner

Cauze legate de toxicitate

Multe cauze au fost asociate cu leziunile miocardice și dezvoltarea cardiomiopatiei dilatative. Utilizarea pe termen lung a drogurilor, cum ar fi cocaina, produce o activare ridicată a sistemului nervos simpatic, cauzând disfuncție ventriculară stângă atât direct, cât și prin tromboza coronariană, spasm coronarian, și ateroscleroză [6]. Abuzul cronic de alcool este una dintre cele mai importante cauze ale acestei boli la adulții din țările dezvoltate. Cardiomiopatia alcoolică este un diagnostic de excludere, și se referă la consumul mediu zilnic de alcool si la durata consumului de alcool. Alcoolismul, atât acut cât și cronic, reduce contractilitatea cardiacă prin mecanisme încă prea puțin înțelese, activând sistemul neurohormonal [188]. Rata de mortalitate estimată pe 4 ani se apropie de 50% la pacienții fără abstinență completă după diagnostic [213].

Antraciclinele, cum ar fi doxorubicina și daunorubicina, sunt medicamente foarte eficiente împotriva cancerului, care sunt prescrise in întreaga lume. Cu toate acestea, mulți pacienți tratați cu aceste medicamente, indiferent de vârstă, au dezvoltat cardiomiopatie dilatativă si insuficiență cardiacă. Mecanismul cauzativ al bolii

Scanned with OKEN Scanner

este multifactorial, dar pare a fi asociat cu generarea de specii reactive de oxigen, perturbări ale mitocondriilor și decuplarea lanțului de transport al electronilor [413, 216] Utilizarea dexrazoxanului ar putea fi cardioprotectoare prin atenuarea formarii de radicali liberi. Depistarea precoce a bolii prin tehnici atât non-invazive cât și serologice se arată a fi promițătoare [123].

În ultimul timp au fost înregistrate progrese semnificative în evidențierea rolului apoptozei în diverse boli de inimă, și în elucidarea mecanismelor moleculare ale apoptozei cardiace. Apoptoza prematură sau accelerată se presupune a fi implicată în declanşarea sau progresia bolii, fapt sugerat de nivelele crescute ale *ADN-il-azei I* la pacienții cu CMD. În ultimul timp au fost înregistrate progrese semnificative în evidențierea rolului apoptozei în diverse boli de inimă, și în elucidarea mecanismelor moleculare ale apoptozei cardiace. Apoptoza prematură sau accelerată se presupune a fi implicată în declanşarea sau progresia bolii, fapt sugerat de nivelele crescute ale *ADN-il-azei I* la pacienții cu CMD. Pierderea progresivă a miocitelor cardiace este unul dintre cele mai importante aspecte patogenice ale insuficienței cardiace. În timp ce studiile inițiale au raportat niveluri nerealist de înalte de moarte celulară, probabil din cauza unor probleme

Scanned with OKEN Scanner

metodologice, studii ulterioare au arătat în mod constant că aproximativ 80-250 de celule ale muşchiului cardiac la 105 nuclee cardiace se auto-distrug la un moment dat, la pacienții cu cardiomiopatie dilatativă în stadiu avansat. Deși rata apoptozei în insuficiența cardiacă este relativ scăzută ca număr absolut, ea este semnificativ mai mare decât aceea din inimile normale, care prezintă o rată de bază neglijabilă a apoptozei. Recent, modele animale de insuficientă cardiacă, încorporând tehnologie transgenică, au confirmat că apoptoza miocitelor în sine este suficientă pentru a induce insuficiență cardiacă. Importanța apoptozei în sistemul cardiovascular devine, de asemenea, din ce in ce mai clară, iar inhibarea apoptozei se arată tot mai mult drept un potențial instrument terapeutic pentru diferite forme ale unor boli cardiovasculare. Celulele se mențin între supraviețuire și apoptoză, și soarta lor depinde de un echilibru între puternice forțe intracelulare și extracelulare, ale căror semnale acționează în mod constant asupra lor şi se contracarează reciproc. În multe situații, apoptoza este un mecanism de auto-protecție programată care duce la auto-distrugerea unei celule atunci când supraviețuirea acesteia este considerată ca nocivă pentru organism. În alte cazuri, apoptoza este un proces patologic care determina multe disfuncții. Recunoașterea

Scanned with OKEN Scanner

mecanismelor de inducere a apoptozei ar putea deschide noi căi de inhibare a morții celulelare la nivelul țesuturile cardiovasculare și, eventual, ar putea ajuta la definirea scopurilor pentru conceperea unor viitoare medicamente. Mai mult decât atât, manifestările din stadiile terminale ale apoptozei, cum ar fi activarea caspazelor din aval sunt, în esență, uniforme în toate tipurile de celule;chiar dacă anumite mecanisme de reglare pot fi unice pentru celulele din țesuturile cardiovasculare. Elucidarea mecanismelor proapoptotice și antiapoptotice în cardiomiocite și în celulele vasculare ale muşchilor netezi ar putea contura ținte potențiale pentru intervenție. În concluzie, s-a dovedit că diverși factori prezenți în miocardul bolnav stimulează apoptoza în miocitele cardiace. Modificările în inducerea genelor ce favorizează sau frânează apoptoza pot influența cuantumul total al miocitelor afectate. Este în continuare necesar să se clarifice rolul pe care diferiții factori genetici și de mediu îl au în moartea sau supraviețuirea celulară [171].

Miocitele cardiace și mecanosenzitivitatea

Fiecare celulă este capabilă să simtă stresul mecanic, fie prin mecanisme moleculare locale, fie

Scanned with OKEN Scanner

descentralizate, și să transforme aceste semnale în mediatori electrochimici și biochimici. Datorită potențialului lor generator de forțe, miocitele cardiace au dezvoltat tulpini suplimentare ale sarcomerului titin I-band și Z-disc, precum și senzori de stres ai liniei M. Amplificarea unui semnal printr-o creștere a concentrației de ioni locale este un principiu general în biologie, ca atare SAC cu siguranță joacă un rol major în celulele nervoase și musculare. Stimularea mecanică, de asemenea, ar putea duce, prin schimbări de conformație, la activarea directă a tirozinkinazelor și/sau a titinkinazei – un efect care ar putea fi numit „mecanozimatică". Activarea directă a receptorilor AT1 prin stimuli mecanici a fost demonstrată și, în acest context, ar fi foarte posibil ca alți receptori, cum ar fi receptorii β, să joace, de asemenea, un rol în mecanosenzitivitate[519].

Conexiuni intercelulare în inimă: Discul intercalat

O funcție cardiacă justă presupune activitatea mecanică și electrică sincronizată a cardiomiocitelor individuale pentru a asigura excitația coordonată și performanța contractilă a inimii, ca organ. Discul intercalat (DI), o structură

Scanned with OKEN Scanner

membranară unică ce, la mamifere, se formează la marginile cardiomiocitelor (Li și Radice, 2010), îndeplinește acest rol, permițând transmiterea activității mecanice și electrice între celulele vecine;(Revizuit în Delmar și McKenna, 2010;. Noorman *et al.*, 2009). Deși descris în mod tradițional ca o compoziție din trei unități separate, datele din ultimul deceniu sugerează că DI-ul cardiomiocitelor este, de fapt, o singură unitate funcțională. Mai multe studii au început să descrie *area composita* ca fiind un hibrid între proteine cu joncțiuni de adeziune și desmozomi care formează o singură unitate de ancorare (Delmar, 2004;. Franke *et al*, 2006; Pieperhoff și Franke, 2007; Saffitz, 2005). În conformitate cu aceasta, plakofilina-2 și desmogleina, care în mod obișnuit sunt localizate în dezmozomi, interacționează cuβ- sau α-catenina respectiv p120 catenina, prezente în joncțiunile de adeziune (Chen *et al*, 2002;.. Goossens *et al*, 2007).În mod similar, au fost identificate legături moleculare între desmozomi si joncțiuni de tip gap (Rohr, 2007; Saffitz, 2005).Ca atare, desmocollina-2 interacționează direct cu connexina-43 (Gehmlich *et al.*, 2011).Considerate împreună, aceste studii sugerează în mod clar că există trei modalități de schimburi și transfer încrucişat al proteinelor de joncțiune, sprijinind ideea că DI-ul este o singură unitate funcțională. În

Scanned with OKEN Scanner

ultimul deceniu, s-au înregistrat progrese semnificative privitoare la compoziția structurală a DI-ului. Numeroase noi proteine au fost identificate drept componente integrale sau periferice ale DI-ului, având o contribuție directă sau indirectă la cuplarea mecanică și electrică a cardiomiocitelor care se învecinează. Provocarea viitorului constă în caracterizarea rolurilor precise pe care aceste proteine le joacă pentru a asigura contracția sincronă a miocardului. Va fi nevoie de o combinație sofisticată de abordări, din punct de vedere molecular, genetic şi celular pentru a lămuri această problemă de o importanță fără echivoc. [519].

MicroRNA – efecte semnificative în rețelele de semnalizare în Cardiomiopatie

Micro ARN (miRNAs) sunt scurte molecule RNA necodificante (~ 22 nucleotide), monocatenare, înalt conservate, care reglementează expresia genelor țintă prin împerecherea de bază cu secvențe specifice de mRNA țintă (Ambros, 2004). MiRNA reglează negativ post-transcripțional expresia genelor, suprimând translarea și/sau inducând degradarea mRNA.Din punct de vedere bioinformatic, se estimează că genomul uman

Scanned with OKEN Scanner

poate conține aproximativ 1000 de miRNAs (Bartel, 2004; Berezikov *et al*, 2005; Griffiths-Jones *et al*, 2008) și sunt continuu identificate alte miRNA (Griffiths-Jones și colab., 2006). MiRNAs modulează expresia proteinelor țintă într-o manieră non-uzuală, prin legarea la secvențe specifice care reglează rețele funcționale. În consecință, un singur miRNA poate viza sute de gene distincte sau, alternativ, expresia unei singure gene de codificare poate fi reglată prin mai multe miRNA diferite (Lewis *et al*, 2005; Miranda *et al*, 2006). Studii recente arată rolul important al miRNAs în reglarea unei multitudini de funcții fiziologice, de la diferențierea celulelor stem până la dezvoltarea şi stresul musculaturii cardiace. (Krichevsky *et al* 2006;. Chen *et al*, 2006;. Zhao *et al*, 2005; Pedersen *et al*, 2007; Kloosterman *et al*, 2007; Felli *et al*, 2005; Tay și colaboratorii, 2008).Mai mult, expresii anormale ale miRNA au fost identificate in diverse boli, inclusiv cancer, diabet și hipertrofie cardiacă/insuficiență cardiacă. Legarea miRNA de ARNm țintă înrudite duce frecvent la o expresie scăzută a genelor țintă prin reprimare translațională sau degradarea ARNm. Pe de altă parte, scăderea expresiei miRNA va conduce la creșterea expresiei genei țintă (Gregory și colab., 2008).Acest domeniu de cunoaştere a permis efectuarea unor studii pe miRNAs, pe

Scanned with OKEN Scanner

specificitatea țesuturilor lor şi specificitatea bolii, dar [pentru moment/ deocamdată] este disponibil un riscant de redus cuantum informațional privitor la profilurile temporale şi spațiale ale miRNAs din inimă. Studii de amploare au folosit analiza micro-matrice pentru a identifica miRNAs modificate care să definească mărcile unor miRNAs modificate într-un fenotip cardiac specific. Cum miRNAs vizează mai multe proteine, aceste mărci au fost folosite pentru predicția gamei de molecule care se modifică. De-a lungul timpului s-au dezvoltat abordări computaționale sofisticate ce au condus la identificarea unor ținte nerecunoscute anterior în cadrul unor parcursuri clinice de interes (Ivanovska şi C l Eary, 2008; Gusev *et al*, 2007).Printre instrumentele de calcul cel mai frecvent utilizați algoritmi de predicție a țintei includ DIANA-microT (Kiriakidou *et al.*, 2004), miRanda (Griffiths-Jones *et al.*, 2006), TargetScan (Lewis şi colab., 2003), TargetScan (Lewis *et al.*, 2005), PicTar (Krek şi colab., 2005) şi PITA (Kertesz şi colab., 2007). Astfel, utilizarea acestor algoritmi oferă sute de ținte care indică faptul ca modificarea expresiei mRNA ar putea avea efecte largi asupra moleculelor care aparțin mai multor cai de semnalizare. Este important de reținut că predicția țintei cu acești algoritmi rămâne o provocare, dar acestea sunt instrumentele disponibile în prezent

Scanned with OKEN Scanner

în domeniu pentru a oferi o perspectivă în înțelegerea rolului miRNA. Aceste ținte predictibile pot fi apoi folosite ca o platformă pentru identificarea cailor de semnalizare și rețelelor modificate care apar in fenotip. Aceste instrumente bioinformatice evoluează și sunt vitale pentru înțelegerea rolului global al miRNAs in cardiomiopatie. Deși reglarea miRNA adaugă un alt nivel de complexitate la o etiologie deja complexă, înțelegerea reglării ar putea oferi noi strategii terapeutice datorită capacității miRNA de a viza mai multe molecule.

Este remarcabil că, deși s-a demonstrat cu mai puțin de un deceniu în urmă funcționarea miRNA la mamifere, conceptul de manipulare a miRNA in vivo pentru a regla procesele legate de boală deja devine o viitoare abordare terapeutică posibilă. Având în vedere implicarea demonstrată a miRNA în multe aspecte ale bolilor de inimă, este obligatoriu să fie înțeles ce stă la baza rolului său înainte de a se trece la studiile pe subiecți umani. Sunt necesare eforturi simultane în direcția unei proteomici contemporane cuprinzătoare împreună cu evaluarea platformelor miRNA care leagă miRNA de expresia proteinei țintă, ca determinanți finali ai fenotipului. Prin urmare, identificarea și validarea țintelor miRNA sunt de o importanță capitală și stabilirea țintelor miRNA va

Scanned with OKEN Scanner

oferi o bază solidă pentru dezvoltarea rețelelor de semnalizare la nivel mondial [171].

Consecințele mutațiilor în genele care codifică troponina cardiacă C, T și I-Perspective moleculare

Troponina cardiacă este principala proteină de reglementare a filamentului subțire și e responsabilă de sensibilitatea Ca^{2+} în interacțiunea actin-miozinei. Troponina formează un complex heterotrimeric format din subunitatea de legare a tropomiosinei (cTnT), subunitatea inhibitorie (cTnI) și subunitatea de legare Ca^{2+} (cTnC).O interacțiune complexă dintre subunitățile troponinei cardiace și alte proteine cu filament subțire, așa cum sunt tropomiosina (Tm) și actina, este esențială in reglarea contracției musculare, care poate fi descrisă de ciclul punților transversale la nivel molecular. Troponina se află de ambele părți ale filamentului subțire, cu o variație de aproximativ 27 Angstromi între două molecule de troponină adiacente (Ebashi, 1972;. Paul et al, 2009). În filamentul subțire fiecare troponină se leagă de o tropomiosină, care acoperă 7 monomeri de actină. Nu este o surpriză faptul că mutațiile în genele care codifică proteinele, care participă la

Scanned with OKEN Scanner

ciclul punților transversale și reglarea acestuia, afectează interacțiunile și duce la disfuncție contractilă şi boli. În toate cele trei subunități de troponină cardiacă, modificările în secvența de aminoacizi au fost identificate în familiile cu cardiomiopatie dilatativă (CMD).Prin urmare, cunoaşterea structurii, funcției și interacțiunii proteinelor este o condiție prealabilă pentru a înțelege disfuncțiile din cadrul acestei boli[519].

Cardiomiopatii asociate cu miopatii microfibrilare

Miopatiile miofibrilare sunt un grup de tulburări neuromusculare eterogene, caracterizate de obicei printr-o miopatie severă, și în general asociate cu cardiomiopatia în 15% până la 30% dintre persoanele afectate. Aceste tulburări musculare genetice sau sporadice sunt caracterizate din punct de vedere morfologic prin dezintegrarea focală al miofibrelor și acumularea ectopică anormală a multor proteine ca urmare a degradării lor. Cele șase gene care până acum, s-au dovedit responsabile pentru aceste tulburări clinice eterogene, eterogene genetic și omogene morfologic, sunt desmin, aB-cristalin, miotilin, LDB3 (ZASP), FLNC și BAG3. Important se

Scanned with OKEN Scanner

prezintă ideea de a fi discutată funcția normală în mușchii scheletici și cardiace a celor șase gene, precum și consecințele fiziopatologice ale mutațiilor lor şi, drept urmare,descrierea modului în care proteinele codificate de aceste gene, împreună cu principalele proteine contractile cum ar fi actina, tropomiosina, miosina, troponina, se integrează în structuri funcționale sarcomerice funcționale, care, la rândul lor, determină principalele funcții cardiace: generarea de forță, transmiterea forței, transmiterea influxului nervos, metabolismul energetic. Un accent deosebit se pune pe un punct de vedere dinamic, care include circuitul proteinei, controlul calității proteinei, cu implicarea sistemelor ubiquitin-proteazomal și autofagic.

De când au fostraportate pentru prima dată în 1978 s-au produs îmbunătățiri considerabile în înțelegerea miopatiilor miofibrilare (Fardeau et al., 1978). Noi căi în cercetare tocmai au fost deschise odată cu dezvoltarea conceptului de control al calității proteinelor, care presupune molecule-insoțitor, sistemul ubiquitine proteazomal, și macroautofagia. Mai mult decât atât, sarcomerul nu mai este considerat acum doar un generator de forță pasiv, ci, şi ca un mecanosenzor care trimite semnale nucleului și întregului sistem de fibre musculare, și care activează programe specifice de

Scanned with OKEN Scanner

reînnoire a proteinelor sarcomerice, în caz de alterare. Aceste noi descoperiri vor ajuta la integrarea mai multor componente ale fiziologiei musculare, și la înțelegerea modului în care acestea sunt modificate atunci când genele cauzatoare de miopatie miofibrilară sunt mutante. Cu toate acestea, doar pentru 20% dintre miopatiile miofibrilare s-a găsit o genă „vinovată", astfel încât este necesar să se analizeze alte gene Z-disc structurale, de control al calității sau de semnalizare pentru a găsi noi candidați responsabili de miopatii miofibrilare [171].

Există şi alte **mecanisme patogenice**: *remodelarea ventriculară, deficitul de sinteză al AMP, tulburări în metabolismul calciului, anormalități energetice, tulburări ale microcirculației.*

Cauza principală a *remodelării* în CMD este pierderea de miocite, care se produce prin compresiune, inflamație, toxicitate, spasm microvascular şi prin alte cauze neindentificate. Creşterea sarcinii *per* miocit, cu ruperea conexiunilor laterale, duce la perturbări ale miocitelor, elongarea şi efilarea peretelui cu hipertrofia ulterioară a miocitelor şi îngroşarea peretelui până aproape de normal. În continuare, creşterea sarcinii *per* miocit perpetuează cercul

Scanned with OKEN Scanner

vicios al necrozei şi remodelării. Scad contractilitatea, viteza de contracţie şi perioada de relaxare.

Scăderea sintezei de *adenozinmonofosfat ciclic (AMPc)* duce la un răspuns funcţional limitat. Dobutamina şi inhibitorii de fosfodiesterază cresc mai slab contractilitatea în comparaţie cu inima normală, iar, pe termen lung, efectul inotrop dispare. Faptul se explică prin desensibilizarea betaadreno receptorilor miocardici şi reducerea considerabilă a numărului lor, ca rezultat al stimulării continue cu norepinefrină. De aceea, pe termen lung *(2-3 ani)*, stimularea simpatică scade sinteza de *AMPc*. Sistemul adenilat-ciclazei *(AC)* este activat de receptorii *ß1* şi *ß2* prin două proteine, una inhibitoare, alta stimulatoare. Norepinefrina scade activitatea catalitică a *AC*, betareceptorii se micşorează numeric cu până la 60%, iar răspunsul lor la inotrope pozitive scade cu până la 90%, ceea ce explică refractaritatea la tratament. În CMD se reduc, mai ales, *ß1* receptorii. Pe aceste date se fundamentează tratamentul betablocant în CMD.

Influxul de Ca^{2+} creşte prin canalele de calciu, reticulul sarcoplasmaticnu îl mai poate prelua, astfel încât, în diastolă, calciul vine în atingere cu (*se leagă de*) miofilamentele, punându-le în tensiune şi jenând umplerea. Aceasta impune

Scanned with OKEN Scanner

necesitatea administrării blocantelor canalelor de calciu pentru ameliorarea performanței diastolice.

Scăderea fluxurilor de ***Na, K, Ca^{2+}, Cl*** determină anomalii de polarizare, ce duc la tulburări de ritm şi conducere, fiind un element prognostic pentru moartea subită. Acelaşi efect îl are şi creşterea Ca^{2+} în citozol. În această situație, miocitul rămâne contractat şi se necrozează, date ce susțin tratamentul inotrop negativ pentru scăderea nevoii de energie.

Pierderea miocitelor duce la creşterea consumului de energie *per* miocit. Aportul de oxigen scade, deoarece masa musculară creşte, iar patul vascular rămâne constant. Hipoxia provoacă scăderea mitocondriilor, *ATP*-ului şi fosfocreatinei. Nivelul lor, determinat prin analiza biopsiei subendomiocardice, ajunge în relație directă cu deteriorarea funcției sistolice.

În cordul normal, **miocitul** se află în raza a 2-3 domenii capilare. Prin dilatare şi tulburare de arhitectonică, un cardiomiocit aflat în raza unui singur domeniu şi funcționând în regim crescut ajunge la hipoxie. Eterogenitatea şi variabilitatea patului capilar face să existe zone potențial dezavantajate, distribuite, aleator, în plaje mici. Acestea sunt zonele ce dau necroza caracteristică CMD, în focare mici.

Scanned with OKEN Scanner

Datele investigațiilor obținute de noi prin realizarea unei analize complexe a materialului demonstrează că CMD nu este o boală independentă, ci reprezintă sfârşitul unor procese patologice polietiologice, cu un sindrom clinic precis conturat (cardiomegalie, insuficiență cardiacă, tulburări de ritm şi conducere, cardialgii, tromboze şi tromboembolii) [53]. Principalii factori cauzali (predispozanți) ai evoluției bolii trebuie considerați următorii:

- *infecția respiratorie virală suferită*
- *apariția la o vârstă precoce a tahiaritmiilor supraventriculare*
- *tulburările microcirculației miocardului*
- *anomaliile predestinate genetic ale proteinelor miocardului*

Una dintre cauzele frecvente de evoluție a CMD (peste 40% din cazuri)constatată de noi o reprezintă infecția respiratorie virală. În asemenea cazuri, CMD poate fi privită ca un sfârşit al miocarditei suferite. Relația directă dintre CMD şi miocardită este confirmată de caracteristicile lor comune, în stadiile avansate ale bolilor, pe carele pun în evidență indicii morfologici, morfometrici şi bioenergetici ai miocardului, parametrii hemodinamicii intracardiace şi ai contractilității

Scanned with OKEN Scanner

periferice ai inimii. Această relație este confirmată de incidență, de caracterul tulburărilor de ritm şi al complicațiilor tromboembolice.

Modificările indicilor imunității celulare şi umorale puse în evidență vin să confirme opinia despre rolul infecției virale, ca punct de plecare al dezvoltării tulburărilor imune şi autoimune la CMD.

Ipoteza **anomaliilor imune** este sugerată de existența unor modificări ale *imunității umorale*, cum ar fi: *autoanticorpi anti-miozină, anti-receptorul* β_1 *adrenergic, anti-receptor muscarinic, anti-proteine mitocondriale* şi *celulare* ce evidențiază scăderea activității limfocitelor-*T* citotoxice şi supresoare şi ale celulelor *killer*. Indicii imunologici sunt modificați la 5-75% dintre bolnavii cu CMD, în majoritatea cazurilor valorile lor inițiale deosebindu-se, totodată, de normă; dar ele nu se deosebesc față de alte cardiopatii, cu excepția conținutului limfocitelor-B, limfocitelor-T-activate şi anafilotoxinei C5a din sânge, care, la CMD, este semnificativ mai ridicat. Activitatea funcțională a supresorilor-T, a celulelor NK şi K la bolnavii cu CMD este evident mai scăzută decât la bolnavii cu cardiopatie ischemică, cu aceeaşi gravitate a insuficienței circulatorii [53].

Datele prezentate arată că aceste anomalii sunt, mai curând, un epifenomen sau, cel

Scanned with OKEN Scanner

mult,impietează asupra evoluției bolii, dar nu sunt cauza ei.

Trombozele şi tromboemboliile reprezintă unele dintre cele mai des întâlnite complicații la bolnavii cu CMD [53]; după datele autopsiei, tromboza intracardiacă a cavităților drepte ale cordului şi tromboemboliile arterei pulmonare se întâlnesc mai frecvent (corespunzător, în 32,6% şi 50% din cazuri). Se evidențiază o interconexiune sigură între prezența trombozelor intracardiace şi apariția tromboemboliilor sistemice; totuşi, spre deosebire de alte cardiopatii, la CMD, trombozele sistemice pot avea loc, cu aceeaşi probabilitate, şi în absența trombilor şi a tromboflebitei membrelor inferioare, incidența cea mai mare fiind în sistemul arterei pulmonare. Două din cauzele trombogenezei sistemice ridicate la bolnavii cu CMD sunt pregnantele tulburări în sistemul hemoreologiei şi al microcirculației şi modificările proprietăților funcționale ale eritrocitelor şi trombocitelor, ce progresează odată cu creşterea gravității insuficienței circulatorii. Prezența fibrilației atriale nu influențează cadența apariției complicațiilor tromboembolice în CMD.

Datele noastre [53] au demonstrat faptul că, la bolnavii de CMD, cu clase funcționale ale insuficienței cardiace III-IV (NYHA), cantitatea de **anexine V şi VI** în miocard se măreşte; mai mult,

Scanned with OKEN Scanner

anexina V se concentrează în zonele de fibroză. Capacitatea anexinei de a se lega cu proteinele matricei extracelulare indică participarea ei la remodelarea miocardului ventriculelor în insuficiența cardiacă. Redistribuirea anexinei V şi VI din CMD în spațiul interstițial poate avea importante urmări funcționale şi indică rolul tulburărilor de expresie a proteinelor miocardului în etiologia şi/sau patogeneza evoluției insuficienței cardiace la bolnavii cu CMD.

Clinic cardiomiopatia dilatativă poate fi evidențiată în trei stadii: asimptomatic, moderat şi sever.

În faza inițială a bolii, bolnavii sunt asimptomatici, chiar dacă uneori prezintă scăderi importante ale fracției de ejecție a ventriculului stâng *(FEVS)*– disfuncție sistolică asimptomatică.

Deşi nu există o definiție clară a **cardiomiopatiei asimptomatice (latente)**, ea poate fi decelată, fortuit, prin identificarea unei cardiomegalii sau a unui suflu de insuficiență mitrală, printr-o dilatare ventriculară stângă nesemnificativă, cu o discretă disfuncție sistolică neexplicată şi care, la examenul histologic al biopsiei subendomiocardice, ulterioare, prezintă modificări morfologice şi morfometrice *(hipertrofie miocitară cu poliploidie nucleară, creşterea numărului de mitocondrii, a incluziunilor lipidice şi scăderea*

Scanned with OKEN Scanner

numărului de miofibrile). Aceste simptome trebuie să apară la un cord cu coronare şi aparat valvular normale ca valoare intrinsecă. Gradul disfuncției sistolice, de la care pacienții devin simptomatici, în mare măsură, depinde de nivelul de activitate fizică curentă: persoanele sedentare devin simptomatice în faze mult mai avansate de boală.

Stadiul simptomatic se întinde pe perioade de luni sau ani. Simptomatologia se dezvoltă treptat, cea mai des întâlnită formă, a primei manifestări, fiind insuficiența cardiacă *(insuficiența cardiacă stângă – frecvent; insuficiența cardiacă dreaptă – rar; biventriculară – în stadiul avansat).* Ocazional, progresiunea este rapidă. Simptomele inițiale, cel mai frecvent înregistrate, sunt *fatigabilitatea* şi *dispneea de efort. Fatigabilitatea* apare înainte de dispnee şi se realizează prin scăderea capacității fizice generale: slăbiciune, oboseală, epuizare. *Dispneea de efort* apare, inițial, ca urmare a unei congestii pulmonare venoase şi constituie un simptom important pentru evaluarea funcției cardiopulmonare. În fazele de debut numai la eforturi mari, iar în stadiile avansate ale bolii, la eforturi uşoare şi chiar în repaus. Dispneea paroxistică nocturnă *(congestia intermitentă),* dispneea de repaus şi ortopneea sunt iminente în decompensarea acută sau în stadiul terminal. De asemenea, urmări ale dispneei sunt hemoptiziile,

Scanned with OKEN Scanner

tusea cronică cu sau fără expectorație *(tuse de stază)*.

Durerile toracice anterioare sunt prezente în până la 40% din cazuri. De regulă, ele apar în boala coronariană nesemnificativ stenozată sau în *„angina pectorală cu coronare normale"*. Aceşti pacienți au o reducere a rezervei de flux coronarian, în ciuda unor coronare angiografic normale, sugerând un grad de ischemie subendocardică prin afectarea microvascularizației coronare. Alteori, bolnavii remarcă dureri în etajul abdominal superior, ca urmare a congestiei hepatice, greață, în caz de stază, în teritoriul splanhnic, distensie pulmonară arterială în hipertensiunea pulmonară, palpitații prin tulburări bradi- sau tahicardice. In stadiile mult avansate, între posibilele etiologii ale durerii toracice, trebuie luat în considerare şi tromboembolismul pulmonar.

Unii bolnavi sunt depistați incidental, prezentând, la examenul radiologic de rutină, cardiomegalie importantă sau au simptome, determinate de anumite complicații, cum ar fi: moartea subită resuscitată, tahiaritmie sau tulburări de conducere, complicații trombo-embolice (cerebrală, periferică, tromboembolie pulmonară).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a îmbunătăți îngrijirea si rezultatele la copiii adulți, este nevoie de o înțelegere extinsă a cauzelor acestor tulburări. În această boală, ventriculul stâng este dilatat, și mai mult sferic decât de obicei cu un nivel ridicat de stres al peretelui și funcția sistolică deprimată. Pot apărea regurgitarea mitrală și aritmiile ventriculare. Ocazional, mai apar alte tulburări de ritm, cum ar fi blocurile atrioventriculare, tahicardia supraventriculară, cu sau fără pre-excitație, inclusiv sindromul Wolf-Parkinson-White, și fibrilatie atrială. În cazurile cele mai grave, persoanele afectate prezintă semne și simptome de insuficiență cardiacă – diaforeza, dispnee in repaus sau la efort, ortopnee, intoleranță la efort, oboseală precoce, dureri abdominale, și paloare. Cașexia și edemul periferic de obicei apar tardiv în cursul bolii. Copiii mici prezintă de multe ori lipsa poftei de mancare si, similar cu adulții, cașexie. Observații comune la examenul fizic mai sunt tahicardia sinusală, ritm de galop, turgescența jugulară, paloare, mâini și picioare reci, hepatomegalie, și un murmur, care este în legătură cu regurgitarea mitrală. În plus, la copii semnele precoce includ edeme periferice și ascită. Diagnosticul depinde de istoricul pacientului, de clinică, de datele ecocardiografice, sau RMN

Scanned with OKEN Scanner

cardiac ce indică prezența cardiomiopatiei dilatative, a insuficienței cardiace, sau ambele[519].

Inspecția evidențiază paloare cutanată, cianoză periferică, turgescență jugulară *(presiune venoasă centrală crescută)*, respirație Cheyne-Stokes

La examenul *fizic* se constată o cardiomegalie predominant stângă, cu impuls apical slab. În raport cu stadiul evolutiv al bolii se întâlnesc, cu frecvență variabilă, ***galoppresistolic***, cvasiprezent, când pacienții sunt în ritm sinusal *(de regulă, rezistent la tratament)* şi **galop protodiastolic**, de obicei, în momentul decompensării. Se decelează, de asemenea: fibrilație atrială şi aritmii ventriculare complexe, galop atrial sau ventricular, şoc apexian hipodinamic lateralizat spre stânga, zgomot III palpabil sau accentuarea zgomotului II la artera pulmonară, semne de insuficiență mitrală *(funcțională)*, pulsații epigastrice proeminente *(insuficiență cardiacă dreaptă)*, reflux hepatojugular pozitiv, pulsații sistolice hepatice, hepatomegalie, semne de congestie periferică *(jugulare turgescente, edeme ale extremităților inferioare)*, revărsat pleural, ascită, eventual anasarcă. Tensiunea arterială, de regulă, este normală sau scăzută, presiunea pulsului – redusă, iar în fazele avansate apare pulsul alternant.

Scanned with OKEN Scanner

Testele de laborator nu sunt patognomonice, dar pot fi utile în detectarea unei eventuale etiologii cunoscute şi este recomandabil să se determine, în mod curent, fosfatemia, ureea şi creatinina, hormonii tiroidieni, sideremia, feritina serică, testul HIV.

Biomarkerii pot fi de folos în diagnosticul clinic, în managementul și prognosticul pacienților, in special pentru cei cu insuficiență cardiacă. Markerii cei mai utilizați pe scară largă sunt peptidul natriuretic de tip B (BNP) și peptidul natriuretic NT-pro-BNP (NT -BNP). La adulți și copii, BNP diferențiază simptomele ce țin de bolile pulmonare versus insuficiență cardiacă [302 -306].

Radiografia toracică pune în evidență o cardiomegalie constantă, indicele cardio-toracic mărit (*ICT>50%)* şi, de regulă, stază pulmonară, eventual revărsat pleural, contractilitate ventriculară redusă, la examenul scopic, cu pulsații cardiace superficiale.

Ecocardiografia este metoda diagnostică de elecție, ce decelează eventualele modificări precoce din CMD, în situația în care elementele clinice manifeste sunt nesemnificative sau lipsesc cu desăvârşire. Ecocardiografia Doppler şi cea bidimensională sunt utile în evaluarea gradului de afectare a funcției ventriculului, arătând: chinetică redusă difuz a pereților ventriculari, scăderea

Scanned with OKEN Scanner

fracției de ejecție şi a fracției de scurtare ale VS *(insuficiență cardiacă sistolică)*, dependentă de severitatea dilatării, trombi intracavitari, grosime normală sau redusă a pereților ventriculari şi a septului, prezența insuficienței mitrale funcționale, care, în unele cazuri, este importantă.

Electrocardiograma prezintă modificări patologice cvasipermanente necaracteristice. In peste 60% din cazuri ritmul este sinusal, în fazele de decompensare survenind tahicardia sinusală. Restul de 40% poate cuprinde întreg spectrul tulburărilor de ritm supraventriculare şi ventriculare, tulburări de conducere intraventriculare, exprimate prin alungire nespecifică de QRS sau bloc complet de ramură. Blocul de ramură stângă *(BRS)* este prezent în peste 35%. Frecvent, se remarcă o asociere a BRS cu blocul atrioventricular *(AV)* gr. I. Blocul de ramură dreaptă *(BRD)* se evidențiază rar, constituind mai puțin de 10%. Adesea pot fi consemnate - hipertrofie ventriculară stângă *(HVS)* - peste 67%, pierderea de potențial R în precordiale sau unde Q patologice *(30%)*, QS în derivațiile anterioare *(pseudoinfarcte)* din cauza zonelor de fibroză. Sunt înregistrate modificări difuze de fază terminală, nespecifice, cu subdenivelări de segment ST, unde T aplatizate, bifazice, dar neischemice. Fibrilația atrială *(FiA)*

Scanned with OKEN Scanner

apare relativ frecvent *(30%)*, deseori poate fi expresia unei boli manifeste şi punct de pornire al unei agravări clinice. Aritmiile ventriculare se întâlnesc într-un număr semnificativ de mare, fără corelație, însă, cu statusul funcțional *(NYHA)* şi tulburările funcționale ventriculare. Monitorizarea ambulatorie *(Holter)* evidențiază constant prezența aritmiilor ventriculare, în circa 50%; acestea din urmă constituie un marker al afectării miocardice întinse în CMD şi sunt asociate cu moartea subită, fără a reprezenta, însă, în mod obligatoriu, cauza ei. În anumite situații, cu precădere la copii, tahicardiile supraventriculare sau ventriculare recurente, sau care nu pot fi sistate – pot constitui cauza disfuncției ventriculare şi nu consecința ei. În aceste condiții, restabilirea ritmului sinusal sau reducerea frecvenței cardiace pot fi terapeutice.

Tulburările de ritm şi conducere, după cum am menționat supra, reprezintă una dintre cele mai frecvente complicații la bolnavii cu CMD, în plus, modificările ECG se înregistrează, practic, în 100% din cazuri [150, 273, 350], de acea am considerat oportună descrierea cvasi-exhaustivă a lor. Conform cu datele noastre [53], la bolnavii cu CMD, în 61,3% din cazuri se întâlneşte ritmul sinusal, în 36,7% – forma constantă de FA, paroxisme de ASV se evidențiază în 23,8 % din

Scanned with OKEN Scanner

cazuri, mai numeroase fiind în stadiile precoce de IC.

Trebuie considerată drept caracteristică incidența ridicată a tulburărilor de conducere. Astfel, blocurile AV de gradele I-II se depistează în 44,3% din cazuri, tulburările de conducere intraventriculară, în 20,2% din cazuri, blocurile de ramură ale fasciculului His – în 28,0% din cazuri, cu precădere de ramură stângă a fasciculului His (BRSFH) la bolnavii cu CMD creşte de la 10,4 %, la IC – CFI-II,până la 24,6% la IC – CF III IV, adică se întâlneşte la IC, practic, la fiecare al patrulea bolnav. Incidența ridicată a blocurilor AV de gradul I (24%-39%) şi HBAS (20,7% - 30%) este confirmată şi de o serie de alți cercetători].

După datele monitorizării ECG-Holter, la bolnavii cu CMD, în proporție de 87,5% s-a întâlnit ESV, la fel, în 27,8% – cu o frecvență peste 1000 în 24 de ore. EV a fost depistată la 96% dintre bolnavi (monotopă – în 8%, politopă – în 92 din cazuri, în grup – în 79,7%, TV – în 58% din cazuri). Trebuie să remarcăm că, dacă incidența ASV odată cu progresarea IC practic nu s-a modificat, incidența extrasistolelor ventriculare, cu excepția celor monotope, a crescut semnificativ ($p < 0,05$), fapt confirmat şi de creşterea sigură ($p < 0,05$) a maximului gradației înregistrate a AV, calculate în puncte de la $3,9 \pm 0,12$ la $4,5 \pm 0,1$.

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai grave TRC, în asociere cu tulburările pronunțate de hemodinamică, se observă la bolnavii cu CMD, cu subtip morfologic de boală preponderent hipertrofică şi fibrotică, în timp ce la bolnavii cu CMD cu modificări morfologice distrofice, tulburările de ritm şi de conducere sunt prezente într-o măsură mai mică.

Criteriile ECG de hipertrofie a miocardului VS au fost determinate în 39,1%, a VD – în 8,7%, hipertrofia combinată a VS şi VD – în 26,1% din cazuri, în timp ce, la investigarea morfopatologică, hipertrofia miocardului diverselor cavități ale miocardului s-a evidențiat în 100% din cazuri. Modificările cicatriceale de focar ale miocardului VS (QS, Qr, r în derivațiile V1-V4) s-au întâlnit la 39,2% dintre bolnavii decedați, totodată, dacă în prezența cardiosclerozei difuze, ce acoperea nu mai mult de 5% din suprafața VS, ele lipseau, la o cardioscleroză moderată şi pronunțată s-au găsit, practic, la jumătate dintre bolnavi. O legitate similară s-a remarcat şi la analiza tulburărilor de conducere intraventriculară, care, în general, pe grupă, s-au depistat la 51,9% dintre bolnavi.

Dacă, la o pregnanță mică a cardiosclerozei, s-a remarcat doar o tulburare incompletă a conducerii intraventriculare, incidența blocurilor de ramură ale fasciculului His a crescut pe măsura progresării modificărilor cardiosclerotice.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru elucidarea rolului probabil al tahiaritmiilor supraventriculare în evoluția CMD, noi am investigat 9 bolnavi (1 grupă) cu diagnostic clinic cu CMD, la care, de la vârsta fragedă a copilăriei (de la naştere sau în primii 5 ani de viață), s-au depistat tahicardie sinusală constantă şi/sau episoade frecvente de ASV. La 5 bolnavi, tipul tahicardiei a fost verificat la efectuarea investigației electrofiziologice: în 3 cazuri s-a constatat tahicardie atrială cronică, într-un caz – combinarea tahicardiei cronice nodulare recidivante şi fibrilație – flutter-atrial şi într-un caz – FA. Vârsta medie a bolnavilor acestei grupe, în timpul investigării, a fost de 16,0 ± 0,3 ani, durata bolii – 8,3 ± 2,3 ani. Grupa a 2-a,de comparație, a fost alcătuită din 11 pacienți, la care începutul bolii putea fi atribuit unei infecții suferite. Vârsta medie a bolnavilor acestei grupe a fost de 21,4 ± 1,1 ani, durata bolii – 1,5 ± 0,5ani. IC CFI-II (NYHA) s-a depistat la 13 bolnavi, CF III-IV (NYHA) – la 8 bolnavi.

Pe ECG, înregistrată în repaus, la toți pacienții din prima grupă s-a constatat tahicardie sinusală, la 4 s-au consemnat episoade frecvente de tahicardie supraventriculară, cu o alură ventriculară de 160-200 pe minut, la 1 – paroxisme de FA cu o alură ventriculară de 160 – 200 pe minut. La 5 bolnavi, tahicardia sinusală s-a asociat

Scanned with OKEN Scanner

cu blocul A-V de gradul I, la 3 – cu tulburare de conducere intraventriculară. La pacienții din grupa a 2-a, în 2 cazuri s-a depistat tahicardie sinusală şi în 2 cazuri – bloc A-V de gradul I.

La monitorizarea de 24h a ECG, la bolnavii primei grupe, pe fondul tahicardiei sinusale constante, cu o alură ventriculară medie de 110,3 ± 6,4 pe minut, la 5 pacienți s-au constatat episoade frecvente de ASV, cu o durată de la 4 la 20h. În afară de aceasta, s-au înregistrat, în medie, pe oră, ESV – 64,0 ± 54,3, EV – 580,7 ± 483,3, EV în salve – 78,9 ± 78,0 şi lambouri de TV – 0,12 ± 0,1. Trebuie să observăm că la 4 pacienți, în timpul nopții, le-a apărut blocul A-V de gradul II tranzitor, de tip Mobitz II. La bolnavii din grupa a 2-a, alura ventriculară medie a fost cert mai scăzută($p < 0,01$), decât la bolnavii din grupa 1 (81,9 ± 2,6 pe minut). Pe oră, numărul de ESV a fost de 38,1 ± 15,4, EV – 31,8 ± 15,4, EV în salve – 0,95 ± 0,5 şi de lambouri TV – 0,05 ± 0,02, diferențele n-au fost sigure din punct de vedere statistic, prin comparație cu indicii analogi ai bolnavilor din prima grupă.

După datele investigației ECOCG, la pacienții primei grupe au fost mărite dimensiunile AS în medie până la 4,7 ± 0,3 cm, DTD şi DTS VS – până la 8,2 ± 0,2 şi, respectiv, 7,1 ± 0,3 cm. %ΔS a fost de 14,0 ± 1,5 şi FE VS – 27%. Trebuie să

Scanned with OKEN Scanner

remarcăm că într-un caz, la ECOCG nu s-a depistat mărirea cavităților drepte ale cordului. În grupa a 2-a AS a fost mărit, în medie, până la 4,5 ± 0,2cm, DTD şi DTS VS – la 7,8 ± 0,4, şi, respectiv, 6,4 ± 0,4 cm. %ΔS a constituit 20,6 ± 1,1 şi FE VS- 36%. Grupele 1 şi 2 nu s-au diferențiat cu certitudine între ele după toți indicii, în afara dimensiunii VD care, la bolnavii grupei a 2-a, a fost mărită, în medie, la 3,1 ± 0,2 cm.

Datele obținute de noi demonstrează posibilitatea evoluției dilatației preponderente a cavităților stângi ale cordului cu agravarea simptomelor de IC, la persoane de vârstă tânără, cu tahicardie îndelungată şi constantă. Pe de altă parte, la bolnavii cu un început presupus infecțios al bolii, s-au remarcat mărirea atât a VS, cât şi a VD ale inimii precum şi o scădere mai semnificativă a FE VS.

Paroxismele frecvente ale tahicardiei supraventriculare sunt considerate un factor probabil de evoluție a formei reversibile de cardiomiopatie; totodată, la o alură ventriculară de peste 150 pe minut, apar manifestări clinice de CMD. În investigația noastră, la bolnavii din grupa 1 s-a depistat mărirea exclusivă a cavităților stângi ale cordului, ceea ce, probabil, s-a datorat prezenței unei tahicardii sinusale îndelungate şi/sau a unor paroxisme frecvente de ASV, deşi

Scanned with OKEN Scanner

alura ventriculară a fost mai scăzută de 150 pe minut. Spre deosebire de aceasta, la pacienții grupei a 2-a, cu debut presupus infecțios al bolii, s-a depistat mărirea, atât a cavităților stângi, cât şi a celor drepte ale cordului, aşadar există o lezare generalizată a miocardului, care a dus deja, a doua oară, la apariția aritmiilor. La bolnavii cu tahicardie îndelungată necontrolată, este posibilă apariția simptomelor de depresie a funcției VS şi evoluția cardiomiopatiei. Aritmia continuă şi/sau paroxismele frecvente de ASV duc la creşterea necesității de oxigen a miocardului. În acelaşi timp, în miocard se epuizează rezervele de ATP, apare vacuolizarea celulară şi se dezvoltă fibroza subendocardică, care reprezintă cauza cea mai probabilă a evoluției disfuncției VS şi a sindromului CMD. În studiile experimentale, dar şi în cele clinice s-a demonstrat că disfuncția VS poate fi pusă în legătură cu epuizarea resurselor energetice ale miocardului, în special, cu scăderea conținutului intracelular de creatină, fosfocreatină şi ATP [183, 514]. Aceasta se confirmă prin faptul că evoluția reversibilă a cardiomiopatiei la bolnavi, după suprimarea ASV, este însoțită de creşterea rapidă a conținutului de ATP în miocard.

În felul acesta, datele expuse duc la concluzia că în tahicardia supraventriculară, inclusiv sinusală, la bolnavii aflați la vârsta

Scanned with OKEN Scanner

copilăriei şi a tinereții, se poate dezvolta disfuncția ventriculului stâng, cu dilatația lui ulterioară, ceea ce se manifestă clinic prin sindromul CMD.

Datele clinice ale ECG în mod corect interpretate pot indica o cardiomiopatie sau absența acesteia folosind o rețea **neuro-fuzzy** cu o optimizare bazată pe biogeografie (BBO). Rezultatele relevă o rată de interpretare corectă pe datele testelor de peste 60%. Fără îndoială, rezultate mai bune pot fi atinse cu o antrenare suplimentară, dar acest studiu [519] demonstrează fezabilitatea demersului și stabileşte un cadru pentru cercetări detaliate ulterioare. Deși rezultatele preliminare ale acestui studiu sunt bune, trebuie aduse multe îmbunătățiri pentru creşterea performanței și care să permită includerea acestei cercetări într-un produs comercial. Informațiile demografice trebuie să fie incluse in datele ECG. Unele teste ECG au fost interpretate în mod corect in proporție de 100%, în timp ce altele au avut o rată de succes foarte scăzută. Pentru o parte dintre pacienți s-au generat date ECG care au identificat cu succes cardiomiopatia/non-cardiomiopatia in doar 2% din cazuri, în timp ce pentru alții s-au obținut date care au dus la interpretări corecte in proporție de 100%.Acest lucru indică faptul că datele demografice sunt importante şi că, pentru testare și

Scanned with OKEN Scanner

antrenare, pacienții ar trebui repartizați in grupuri cu caracteristici similare. Unele dintre acestea se referă la sex, rasă, utilizarea de medicamente și vârstă. Acest lucru va deveni posibil pe măsură ce se vor efectua mai multe studii clinice, și se vor colecta date de la mai mulți pacienți.

4.3. CIRCULAȚIA CORONARIANĂ ȘI INTRAMIOCARDICĂ LA BOLNAVII CU CMD

La investigarea materialului autopsiat s-a constatat că arterele coronare, la bolnavii cu CMD, de regulă nu sunt modificate, stenoza lumenului și modificările aterosclerotice lipsind, deși aceasta depinde de vârsta avută în momentul morții. La bolnavii vârstnici pot fi depistate modificări aterosclerotice nesemnificative hemodinamic, totuși gradul acestor modificări este de necomparat cu gravitatea modificărilor morfologice ale miocardului [190]. Arterele intramiocardice mici, în majoritatea cazurilor sunt normale, însă, destul de frecvent se depistează îngroșarea intimei lor, în special, în porțiunile cardiosclerozei [19, 144, 190].

La **efectuarea coronarografiei**, la bolnavii cu CMD se depistează artere coronare largi, dezvoltate, având ramificație tipologică. Diametrul

Scanned with OKEN Scanner

arterelor coronare în sistolă şi diastolă la bolnavii cu CMD şi MC a fost semnificativ mai mare, iar indicele extensibilității – mai mic decât în grupa de control. Nu s-au remarcat diferențe clare de indici între bolnavii cu CMD şi MC, cu excepția diametrului diastolic al arterei coronare drepte descendente. Cu toate acestea, diametrele arterelor coronare au fost mai mari, iar indicii extensibilității corespunzător mai mici la CMD. În acelaşi timp, se observă trecerea încetinită prin ele a substanței de contrast, reținerea acesteia în trunchiurile mari, mai lent decât în mod obişnuit, se contrastează arterele de ordinul 3-4 [4]. În afară de aceasta, se remarcă spălarea încetinită a substanței de contrast.

Investigațiile anterioare ale circulației coronariene la bolnavii cu CMD au evidențiat valori normale, luând în calcul o unitate de masă a miocardului VS în condiții de repaus [132]. Totodată, la folosirea metodei termodiluției s-a remarcat scăderea certă a circulației coronariene, calculată pe unitatea de masă a miocardului, atât în repaus, cât şi la tahicardia produsă de stimularea frecventă atrială. Rezistența coronariană normalizată, la bolnavii cu CMD, ca răspuns la stimulare a scăzut, totuşi a rămas evident mai ridicată în raport cu grupa de control, ceea ce la aceştia denotă diminuarea rezervei

Scanned with OKEN Scanner

coronare [179]. Introducerea intracoronară la bolnavii cu CMD a unor preparate vasodilatatoare a dus la augmentarea mai puțin pregnantă a circulației coronariene în arterele coronare epicardice, în comparație cu grupele de control [72, 132, 190]. S-a arătat că, în cazul introducerii intracoronariane a papaverinei la bolnavii cu CMD şi CPI, la ultimii timpul de atingere a vitezei maxime a fluxului sanguin în artera coronară anterioară descendentă a fost semnificativ mai mare, ceea ce, după opinia autorilor, indică diferențele dintre mecanismele de scădere a rezervei coronariene la CMD şi CPI.

Ca răspuns la introducerea substanțelor coronarodilatatoare (izoproterenol) în cazurile de CMD, tulburarea relaxării a indicat şi nivelul microvaselor miocardului [73]. La măsurarea fluxului sanguin coronarianprin folosirea senzorului Doppler, în artera anterioară descendentă a bolnavilor cu CMD, ca rezultat al introducerii intracoronariene a adenozinei, acesta s-a mărit într-un grad similar cu grupa de control, dar la introducerea acetilcolinei [254], spre deosebire de grupa de control, nu s-a schimbat. Întrucât adenozina acționează nemijlocit asupra musculaturii netede a vaselor, iar acetilcolina posedă un efect vasodilatator endoteliu-dependent, autorii consideră că bolnavii cu CMD

Scanned with OKEN Scanner

prezintă tulburări de reglare endoteliu-dependentă a curentului sanguin intramiocardic. Astfel, studiile prezentate *supra* demonstrează la bolnavii cu CMD creşterea evidentă a tonusului arterelor coronariene, scăderea fluxului sanguin coronarian, micşorarea rezervei dilatatoare a arterelor coronare ca răspuns la vasodilatație şi, prin urmare, scăderea aşa-numitei rezerve coronariene.

Modificările produse pot fi puse pe seama componenților extracoronarieni care influențează rezistența coronariană, în special, prin creşterea PTD VS şi, ca urmare a acesteia, prin accentuarea tensiunii subendomiocardice a inimii şi a tensiunii de perfuzie [190] sau, puse direct pe seama perturbărilor structurale şi/sau funcționale ale patului microvascular al miocardului.

Încă din anul 1964, James T. [133] a propus ideea de evoluție a CMD, în care un rol important revine lezării porțiunilor distale ale arterelor venoase. Ulterior, în investigațiile lor experimentale,Factor S. şi Sonnenblick E. [88] au arătat că spasmul microvascular poate duce la necroze de focar ale miocardului şi, respectiv, poate reprezenta un mecanism patogenic în evoluția CMD. Totuşi, în unele studii, un asemenea punct de vedere nu şi-a găsit confirmarea.

Scanned with OKEN Scanner

Macroscopic cardiomiopatia dilatativă este asociată cu remodelarea complexă a unuia sau a ambilor ventriculi, rezultând într-o schimbare a formei ventriculului și a arhitecturii fibrelor miocardului. Examinarea macroscopică arată de obicei mărirea tuturor camerelor, cu o mai mare dilatare a ventriculilor decât a atriilor. Valvele și arterele coronare epicardice sunt de regulă normale. În unele cazuri, sunt prezenți trombi intracavitari, mai ușor de văzut în zona apexului ventriculului stâng.

La investigarea macroscopică efectuată de noi s-a depistat, în toate cazurile, mărirea tipică pentru bolnavii cu CMD a tuturor cavităților inimii. În majoritatea observațiilor s-a constatat dilatarea cu precădere a cavităților stângi ale inimii; totuşi, la compararea valorilor medii ale volumelor cavităților VS şi VD, nu s-au evidențiat diferențe substanțiale din punct de vedere statistic.

Volumul general al inimii a depăşit valorile normale, iar valorile individuale au oscilat în limite de la 450 la 1300 de grame. La cântărirea separată, masa miocardului VS, VD şi SIV a fost, de asemenea, mărită esențial, ceea ce demonstrează hipertrofierea totală a miocardului la toți bolnavii cu CMD. Gradul hipertrofiei VS şi VD s-a aflat în directă dependență cu durata bolii,

Scanned with OKEN Scanner

fapt care concordă cu datele altor cercetători [112, 215, 221].

Grosimea pereților ventriculelor şi ai SIV la diferite niveluri s-a aflat în limitele unor valori normale; totodată, nu a putut fi stabilită o conexiune între grosimea pereților, masa inimii şi volumul ventriculelor. Pe baza aceasta, grosimea pereților ventriculelor, care, în practică, este cel mai frecvent determinată prin metoda ecocardiografică, nu trebuie considerată drept un criteriu al prezenței sau absenței hipertrofiei miocardului la bolnavii cu CMD.

După părerea majorității autorilor, mărirea semnificativă a masei inimii la bolnavii cu CMD, ca urmare a unei hipertrofii net exprimate a miocardului reprezintă unul din simptomele morfologice specifice ale bolii [1, 3, 14, 215].

Modificările sclerotice ale miocardului s-au întâlnit, cel mai frecvent, în peretele liber al VS (92,3% cazuri) şi SIV (86,5%) – şi mai rar în VD (69,2%). Suprafața cardiosclerozei pe cavități ale inimii a constituit în medie 10,7 ± 1,6%, 8,0 ± 1,6% şi 7,4 ± 1,3%. În diferite cavități ale miocardului, a predominat cardioscleroza difuză, cardioscleroza microfocală precum şi combinarea lor.

Conform datelor din literatura de specialitate, tocmai aceste tipuri de modificări cardiosclerotice ale miocardului sunt caracteristice pentru bolnavii

Scanned with OKEN Scanner

care au suferit o miocardită [14, 215, 217, 238). Cardioscleroza macrofocală a fost depistată în special în VS (21% cazuri) şi, extrem de rar, în VD şi SIV. Gradul de pregnanță a modificărilor cardiosclerotice în diferite cavități ale miocardului a variat în limite largi, totuşi, în VS, suprafața cardiosclerozei a fost de circa 10%, în VD s-a constatat de la 5 la 10%, iar în SIV cardioscleroza nu a depăşit 5% din suprafață, în jumătate din cazuri.

Modificările cardiosclerotice ale miocardului VS la bolnavii cu CMD s-a aflat în directă dependență de masa miocardului şi durata bolii. Astfel, la o evoluție îndelungată a bolii, odată cu progresarea hipertrofiei miocardului creşte şi gradul modificărilor sale sclerotice. Interacțiunea dintre pregnanța cardiosclerozei şi durata evoluției bolii la bolnavii cu CMD a fost sesizată şi în alte studii [1, 14].

Arterele coronare subepicardice principale ale cordului bolnavilor cu CMD decedați erau intacte sau prezentau o mică leziune ateroscrelotică, ce ocupa o arie nesemnificativă din suprafața inimii (în limite de 10–15 %), reprezentată de plachete lipofibroase turtite şi de strii adipoase. În nici unul dintre cazuri nu s-au depistat stenoze semnificative hemodinamic (peste 50% din lumenul vaselor) ale arterelor coronare.

Scanned with OKEN Scanner

La majoritatea bolnavilor cu CMD, în zonele miocardului hipertrofiat, fără cardioscleroză, s-au evidențiat modificări nesemnificative (de grad 1) ale arterelor mici şi ale arteriolelor, care constau, în primul rând, în hiperplazia mediei. Intima arterelor mici a fost îngroşată nesemnificativ în segmente separate ale perimetrului vaselor sau circular. În asemenea cazuri, grosimea intimei nu a depăşit jumătate din grosimea mediei. Lumenul arterelor mici, cu excepția a două cazuri, a fost puțin lărgit, ceea ce s-a confirmat printr-o oarecare diminuare a gradului de corelare dintre grosimea mediei şi diametrul interior (0,2), puțin mai redus decât în grupa de control (0,25).

Modificările arterelor mici, cu grad moderat şi semnificativ de pregnanță, s-au întâlnit cel mai frecvent în zonele de cardioscreloză focală. Totodată, s-a observat o îngroşare a pereților arterelor pe seama măririi cantității de celule cu musculatură netedă, în media şi în intimă. Într-o serie de cazuri, dispunerea straturilor acestor celule în intimă a fost longitudinală, amintind de conformația aşa-numitelor artere longitudinale. Modificările sclerotice în pereții acestor artere au fost moderat pronunțate, în timp ce lumenul, pe seama îngroşării semnificative a pereților, a fost îngustat (raportul grosimii mediei cu diametrul

Scanned with OKEN Scanner

lumenului vaselor a fost egal cu 1; normal, după cum s-a remarcat *supra*, egal cu 0,25).

Modificările hipertrofice ale pereților **arterelor miocardice mici** la CMD, pe de o parte, din cauza îngustării lumenului acestor vase, au putut duce la tulburarea vascularizării fibrelor musculare, iar, pe de altă parte, probabil, au putut reprezenta o bază pentru reacții angiospastice.

În **arteriolele miocardului**, s-a remarcat doar o oarecare îngroşare a mediei. Destul de frecvent, s-a observat o plicaturare nesemnificativă a membranei bazale a endoteliului vaselor, puțin tumefiat, obținând uneori o anume poziție verticală, fapt considerat drept unul din simptomele spasmului intravital al arteriolelor. La investigația morfologică,probabilitatea spasmului intravital al arterelor şi arteriolelor intramiocardice este remarcată si de alți cercetători [18, 233]. Astfel, modificările morfologice ale verigii arteriale din patul microvascular, depistate de noi, au putut constitui fără nici un dubiu baza structurală a lezării primare şi/sau secundare hipoxice a cardiomiocitelor la CMD, ceea ce confirmă, indirect, concepția rolului arteriolospasmului coronarian în etiologia şi/sau patogeneza bolii [133, 230].

Destul de caracteristice pentru CMD au fost **modificările venulelor şi ale venelor mici,**

Scanned with OKEN Scanner

exprimate prin lărgirea diametrului lor şi printr-o hiperemie semnificativă, ceea ce, probabil, a dus la încetinirea fluxului sanguin şi a favorizat, astfel, hipoxia fibrelor musculare.

Prezența hipoxiei cronice a miocardului la CMD este confirmată şi de rezultatele investigațiilor morfometrice. Astfel, **densitatea capilarelor** în miocardul bolnavilor cu CMD a fost cert mai scăzută decât în grupa de control (39,0 ± 2,8 în comparație cu 48,0 ± 3,7 în câmpul vizual, $p < 0,05$ sau 977,0 ± 22,0, față de 1212,0 ± 36,0, pe 1mm2 $p < 0,05$). În porțiunile cardiosclerozei difuze s-a observat mărirea distanței dintre capilare şi fibrele musculare (23,2 ± 0,5 milimicr la CMD şi 17,4 ± 0,4 milimicr în grupa de control, $p < 0,01$). La calcularea în câmpul 1 vizual, s-a observat de asemenea reducerea stării de repletiune sanguină a capilarelor miocardului la bolnavii cu CMD, fapt exprimat în scăderea mai mult decât dublă a cantității de eritrocite în capilarele ventriculului stâng, prin comparație cu martorul (45,5 ± 5,8 şi 93,0 ± 3,5, $p < 0,001$).

Biopsia subendomiocardică poate fi utilizată pentru a identifica in unele situații cauza acestei boli [82]. Histologia muşchiului inimii este utilă din punct de vedere clinic pentru a distinge între procese ale bolii care au nevoie de strategii alternative de tratament, cum ar fi bolile de

Scanned with OKEN Scanner

depozitare, bolile maligne, sarcoidoza, și hemochromatoza.

Examinarea microscopică arată, în general, zonele de fibroză interstițială și perivasculară, și, uneori, zone de necroză și infiltrare celulară. Dimensiunea miocitelor variază foarte mult, cu unele celule atrofiate și altele hipertrofiate. La copii, se pot observa la microscopie rezultate anormale de formă, dimensiuni și număr de mitocondrii (cu sau fără incluziuni), depozite anormale de glicogen, sau lizozomi anormali cu vacuolizare.

Confirmarea miocarditei virale se poate face uneori prin biopsia subendomiocardică, cu identificarea negativă a virusului, miocardita imun-mediată, care ar putea conduce la un tratament suplimentar, cum ar fi terapiile de imunomodulare sau imunosupresie [81, 90, 117, 236, 431]. Identificarea virusului cauzator prin genomul viral al acestuia cu PCR în probele de biopsie subendomiocardică, a fost utilă pentru stabilirea cauzei miocarditei, și a clarificat faptul că unele cazuri de cardiomipatie dilatativă sunt rezultatul miocarditelor cronice [49]. În plus, această abordare de diagnostic permite strategii de tratament îmbunătățite și prognosticuri de precizie.

Scanned with OKEN Scanner

Analiza **morfologică** a cardiobioptatelor unui număr de 43 de bolnavi cu diagnostic clinic cu CMD efectuată de noi [53], la 21 dintre aceştia s-au depistat modificări exudativ-proliferative şi distrofice ale miocardului. Modificările exudativ-proliferative au fost reprezentate de edem interstiţial şi infiltraţia stromei miocardului cu celule de tip limfocitar, cu un amestec, mai mare sau mai mic, de celule de natură histiocitară şi aşa numita infiltraţie limfohistiocitară a miocardului. Uneori, printre elementele celulare ale infiltraţiilor miocardului, au predominat macrofagii. Celulele limfocitare şi macrofage s-au grupat în jurul vaselor stromei sau au pătruns, difuz, miocardul. La toţi bolnavii acestui grup, s-au manifestat dereglări microcirculatorii, cu o creştere a permeabilităţii patului vascular, ceea ce a dus la exudarea proteinelor plasmatice.

La jumătate dintre bolnavii acestui grup s-a depistat afectarea arterelor intramurale şi a arteriolelor, după tipul vasculitelor necrozante şi proliferative.

La vasculitele alterante s-a detectat necroza tuturor membranelor arterelor şi arteriolelor. Adesea, pereţii vasculari necrozaţi au fost infiltraţi cu macrofagi.

La vasculitele profiferative s-a observat o creştere a numărului de celule cu musculatură

Scanned with OKEN Scanner

netedă şi endoteliale, cu obliterarea lumenului vasului.

La toți bolnavii s-au evidențiat modificări distrofice şi necrobiotice în cardiomiocite. Modificările generalizate distrofice ale cardiomiocitelor (distrofia granulară şi vacuolară) şi miocitoloza manifestă au dus la distrugerea unor zone mari ale miocardului şi la substituirea lui cu țesut conjunctiv.

La fiecare al patrulea bolnav, tabloul microscopic al miocardului s-a caracterizat prin distrucția pronunțată a cardiomiocitelor. Totodată, cardiomiocitele modificate necrobiotic aveau aspectul detritusului microgranulos eozinofil, fapt urmat de reacția celulară limfomacrofagică. În jurul cardiomiocitelor distruse s-au format aglomerări de 5-10 celule de natură histiocitară, care, probabil, participă la resorbția miocitelor, substituite ulterior de țesutul conjunctiv.

Modificările din miocard, enumerate *supra*, reflectă tabloul morfologic al miocarditei nespecifice descrise în bibliografie [12, 13, 16]. O caracteristică a bolnavilor investigați de noi, cu diagnostic morfologic de miocardită nespecifică, a reprezentat-o faptul că acestora li s-a efectuat biopsia endomiocardică la date relativ târzii de la apariția primelor simptome (50% dintre ei au fost investigați nu mai puțin decât după 36 de luni de

Scanned with OKEN Scanner

la debutul bolii). Din această cauză, miocardita, evidențiată la bolnavii cu un complex de simptome clinice de CMD, a fost, în esență, cronică. Miocardita cronică se caracterizează prin combinarea modificărilor inflamator-infiltrative şi distrofice ale miocardului, cu hipertrofia cardiomiocitelor şi dezvoltarea cardiosclerozei perivasculare şi difuze interstițiale substitutive.

La evoluția de durată a miocarditei, în focarele de cardioscleroză s-au depistat fibre musculare atrofiate alături de scleroza vaselor sanguine, iar în afara focarelor de cardioscleroză – o hipertrofie compensatoare a cardiomicitelor.

Astfel, la bolnavii cu complex de simptome clinice de CMD, miocardita depistată la investigarea morfologică a cardiobioptatelor s-a caracterizat prin infiltrație limfohistiocitară a stromei miocardului, edem şi îmbibare plasmatică a țesutului interstițial al miocardului, prin dezvoltarea modificărilor distrofice şi necrobiotice ale cardiomiocitelor, precum şi prin vasculite ale arterelor intramurale şi ale arteriolelor. La evoluția de durată a miocarditei, se evidențiază cardioscleroza interstițială, perivasculară, substitutivă şi difuză.

Diagnosticul morfologic de CMD a fost pus la 22 de bolnavi, pe baza datelor clinico-instrumentale de observație, fără excluderea

Scanned with OKEN Scanner

miocarditei, a cardiomiopatiei etanolice şi a altor boli specifice ale miocardului, pe materialul biopsiilor endomiocardice. La microscopia optică a cardiobioptatelor bolnavilor cu diagnostic clinico-morfologic de CMD, s-au depistat diferite tipuri de fibroză miocardică: microfocare de cardioscleroză substitutivă (27% de cazuri), scleroză perivasculară (45% de cazuri) şi,cea mai tipică dintre ele, cardioscleroza difuză, interstițială, care s-a detectat la 64% din bolnavi.

La bolnavii cu diagnostic clinico-morfologic de CMD, modificările structurale ale miocardului s-au dovedit a fi extrem de polimorfe. Cel mai caracteristic tablou microscopic al miocardului a constat în hipertrofia inegală a fibrelor musculare. Într-un câmp vizual s-a putut vedea hipertrofia pronunțată a cardiomicitelor, combinată cu atrofia unora dintre acestea. La 73% dintre bolnavi s-au depistat simptome de hipertrofie a nucleelor cardiomiocitelor: mărirea suprafeței lor, sinuozitatea membranei nucleare, hipertrofia nucleolilor.

La majoritatea bolnavilor cu diagnostic clinico-morfologic cu CMD s-au manifestat simptome de miocitoliză. Deja la microscopia optică a secțiunilor semifine ale miocardului s-au putut vedea diferitele ei stadii de dezvoltare, de la

Scanned with OKEN Scanner

apariția suprafețelor goale, până la distrugerea completă a fibrei musculare.

Prin investigarea electrono-microscopică centrată a cardiomiocitelor cu simptome de miocitoliză, s-a descoperit o atrofie netă a miofibrilelor. Miofibrilele s-au arătat a fi rarefiate şi extrem de efilate, cu sarcomeri elongați sau hipercontractați. În zonele lizei şi ale atrofiei miofibrilelor s-au relevat modificări distructive ale mitocondriilor.

La 33% dintre bolnavii cu diagnostic clinico-morfologic cu CMD s-au decelat necroze ale cardiomicitelor. La investigarea electrono-microscopică, în cardiomicitele modificate ireversibil, s-a evidențiat tumefierea pronunțată a mitocondriilor, erodarea, spălarea completă a matricei lor, precum şi fragmentarea şi dezagregarea miofibrilelor.

La compararea indicilor morfometrici la bolnavii cu CMD şi MC nu s-au putut evidenția diferențe substanțiale.

Mai mult, dacă excludem modificările caracteristice pentru miocardita nespecifică (infiltrația limfohistiocitară a stromei miocardului, edemul şi îmbibarea plasmatică a țesutului interstițial, vasculita arterelor intramurale şi a arteriolelor), adică modificările infiltrativ-proliferative, atunci tabloul morfologic al

Scanned with OKEN Scanner

miocarditei nu diferă, practic, de cel al CMD (procese distrofice şi necrobiotice, hipertrofia fibrelor musculare, cardioscleroză substitutivă perivasculară, difuză şi microfocală). Datele expuse confirmă, indirect, opinia posibilei interconexiuni dintre miocardită şi dezvoltarea ulterioară a CMD.

După cum s-a subliniat anterior, la 27% dintre bolnavii cu diagnostic clinico-morfologic de CMD, s-au depistat focare de scleroză substitutivă a miocardului, cu fenomene de scleroză a vaselor intramurale, ceea ce poate demonstra începutul bolii lor cu miocardită, însoțită de vasculită proliferantă şi necrotică.

La investigarea compoziției polipeptidice a proteinelor miocardului bolnavilor cu CMD, prin utilizarea metodei electroforezei bidimensionale la 3 din 5 cazuri s-a depistat prezența unei fracțiuni proteice suplimentare în lanțul uşor de miozină, identic cu lanțul uşor de miozină-1, totuşi, cu o masă moleculară mai mică (22,5 KDa). La analiza computerizată a electroforegramelor suprafeței lanțurilor uşoare de miozină, LC1 şi LC2 în grupul de control s-au aflat în raport de 1,0:1,0, în timp ce, la bolnavii cu CMD - 0,5:1,0, iar la sumarea LC1 cu proteina suplimentară LCD – de 0,9:0,1. Izoformele modificate, atât ale lanțului uşor, cât şi ale celui greu de miozină la bolnavii cu CMD, au fost

Scanned with OKEN Scanner

depistate, în ultimul timp, şi de către alţi cercetători [78, 266]. Astfel, exprimarea prin gene a formelor modificate, importante, atât în planul structural, cât şi în cel funcţional, al proteinelor miocardului, poate fi, pe de o parte, cauza distrugerilor funcţiei contractile a miocardului şi poate juca în acest fel un rol în patogeneza unor forme anumite, mai exact, în patogeneza formelor ereditare de CMD; pe de altă parte, ea poate fi un substrat favorabil pentru influenţarea, de către virusuri şi/sau alţi agenţi patogeni, a miocardului.

Prin studierea morfometrică a cardiobioptatelor, la bolnavii cu diagnostic clinico-morfologic de CMD, am înregistrat patru subtipuri morfologice de boală:

- hipertrofică
- fibrotică
- distrofică
- modificări morfologice minime

La subtipul hipertrofic a predominat hipertrofia miocardului, fapt confirmat cu certitudine de valorile mai ridicate ale diametrului fibrelor musculare şi ale suprafeţei nucleelor cardiomiocitelor, prin comparaţie cu alte grupe. Suprafaţa cardiosclerozei în această grupă a fost de asemenea semnificativă, în medie, depăşind 10%

Scanned with OKEN Scanner

din suprafața miocardului, totuşi, ea a fost sigur mai mică decât în subtipul fibrotic de CMD, când suprafața cardiosclerozei a depăşit 20% din suprafața miocardului; totodată, hipertrofia miocardului a fost moderat pronunțată. Pentru subtipul de CMD distrofic, s-au arătat a fi caracteristice modificările distructive (vacuolizarea citoplasmei şi miocitoliza) şi necrobiotice ale cardiomiocitelor, la o cardioscleroză moderată, până în 5% din suprafața miocardului şi în absența unor simptome evidente de hipertrofie a miocardului. Indicii morfometrici, la bolnavii cu CMD cu modificări minime morfologice, nu s-au deosebit de subtipul distrofic de CMD, totuşi modificările distructive şi necrobiotice ale miocardului au lipsit.

Datele expuse mai sus demonstrează nu doar absența specificității, ci şi eterogenitatea esențială a modificărilor morfologice şi morfometrice la bolnavii cu CMD, ceea ce poate releva, cel mai probabil, sau stadii diferite de evoluție a procesului patologic în momentul investigării sau/şi influența primară a unor diverşi factori etiologici asupra miocardului. Probabilitatea naturii polietiologice a CMD este atestată de mulți autori [10]. Astfel, Kawai C. şi alții [132] consideră că, dacă suprafața cardiosclerozei, la bolnavii cu CMD, depăşeşte 25% din suprafața miocardului,

Scanned with OKEN Scanner

atunci asemenea variantă de CMD reprezintă cu o mai mare probabilitate urmarea miocarditei suferite. În alte studii, există trimiteri la faptul că varianta hipertrofică de CMD este caracteristică pentru forma „postmiocarditică" [182] şi „familială" de boală [37, 119]. Aşa cum am subliniat anterior, după opinia noastră, caracterul manifest al hipertrofiei miocardului şi al modificărilor cardiosclerotice reflectă într-o mai mare măsură durata evoluției bolii la bolnavii cu CMD.

Unii autori consideră variantele de CMD cu modificări distrofice sau minimale morfologice drept o formă „latentă" de CMD [366]. După toate probabilitățile, acest fapt nu este întru totul just, întrucât, la aceşti bolnavi au existat deja manifestări clinice de boală, inclusiv tulburări grave de ritm cardiac. În aceste cazuri, este mai corect să vorbim de stadii precoce, primare, ale procesului patologic, a cărui cauză, totodată, o reprezintă cel mai probabil alți factori patogeni decât inflamația miocardului.

La cercetarea **perfuziei** miocardului VS prin folosirea tomografiei computerizate cu emisie de pozitroni cu Tl-201, s-a demonstrat că, la majoritatea bolnavilor de MC, există ample defecte plurifocale ale perfuziei în repaus; totuşi, s-au întâlnit şi zone, nesemnificative ca dimensiune, de

Scanned with OKEN Scanner

acumulare scăzută a taliului. Defectele perfuziei la MC sunt condiționate , probabil, ori de fibroza miocardică, ori de infiltrația inflamatoare.

Distribuirea defectelor perfuziei pe segmente de VS nu a avut un caracter logic la nici una din grupele investigate. Prin combinarea VRE şi a scintigrafiei miocardului cu Tl-201 în repaus, efectuate la 25 de bolnavi cu CMD şi la 13 bolnavi cu CPI, coincidența zonelor contractilității compromise ale miocardului cu defectele de perfuzie s-a remarcat la 80 % dintre bolnavii cu CMD şi la 84,6 % dintre bolnavii cu CPI. Diskinezia la CMD s-a combinat cu defectele de perfuzie în 62,5% din cazuri, asincronia – în 61,9%, hipokinezia – în 88,8 %.

Conform datelor investigației complexe instrumentale (ECG, ECOCG, CVG, necropsie) la bolnavii cu CPI, cel mai frecvent, în 75% din cazuri, defectele perfuziei au coincis cu localizarea modificărilor cicatriceale din miocard. La pacienții din grupa CMD, această concordanță s-a evidențiat doar în 31,8%, iar la bolnavii cu MC – în 23,0%.

După datele unei serii de lucrări clinico-morfologice, la CMD, nu se observă un procent ridicat de coincidență a zonelor asinergice cu defectele perfuziei şi cu modificările cicatriceale de focar din miocard [269]. Segmentele asinergiei la bolnavii cu CMD au fost distribuite, preponderent,

Scanned with OKEN Scanner

în regiunile antero-septale şi apical-diafragmatice, iar defectele perfuziei – în toate regiunile VS. Aceasta ne trimite la faptul că, probabil, tulburarea sincronismului mişcării peretelui inimii, în special diskinezia, în majoritatea cazurilor s-a mai combinat şi cu BRS. Frecvența coincidențelor defectelor de perfuzie, în dependență de prezența sau absența BRS, a fost scăzută, atât în grupa bolnavilor cu CMD, cât şi în grupa bolnavilor cu CPI. Suprafața defectelor perfuziei nu a diferit, practic, între bolnavii cu CMD şi CPI, totuşi a fost vădit mai mare la bolnavii cu MC. Trebuie să observăm că, dacă la CMD şi MC dimensiunile defectelor n-au depins de gravitatea IC, la CPI modificări vizibil mai pronunțate au fost depistate la IC CF – III-IV (NYHA). Astfel, scintigrafia miocardului cu Tl-201în repaus nu prezintă importanță în diagnosticul diferențial dintre CMD, MC şi CPI.

Nivelul cel mai ridicat al captării Tl-201 de către miocardul în repaus se remarcă la bolnavii de MC (4,5 ± 0,5%), cel mai scăzut – la bolnavii de CPI (3,2 ± 0,4); la bolnavii cu CMD acest indice a avut o valoare intermediară (3,6 ± 0,1%). Diferențele sunt statistic evidente doar pentru grupa bolnavilor de MC şi CPI ($p < 0,01$). Întrucât, în normă, captarea Tl-201 de către miocardul ventriculului stâng, conform datelor laboratorului

Scanned with OKEN Scanner

nostru, reprezintă în medie 1,7 ± 0,1% în toate grupele investigate, acest indice a fost semnificativ ridicat. Conform datelor lui Hamilton G. *et al.* [180], captarea de Tl-201 poate creşte la încetinirea vitezei curentului sanguin coronarian produs la CMD, la mărirea suprafeței patului capilar şi la hiperemia reactivă inflamatoare şi se observă la bolnavii de MC.

La efectuarea testului cu dipiradamol la bolnavii cu CPI, s-a observat mărirea defectelor perfuziei în 71,9% din cazuri; la bolnavii cu MC – dimpotrivă, în 66,8% din cazuri s-a remarcat scăderea lor, în 16,6% – lipsa reacției la preparat, iar în 16,6% – mărirea defectelor perfuziei. La bolnavii cu CMD, modificările pe scintigrame, ca răspuns la introducerea dipiridamolului, au fost variate: în 41,9% din cazuri defectele perfuziei au dispărut, în 16,6% – au scăzut, în 13,8% – s-a remarcat pronunțarea lor, în 11,1% – detectarea lor în diferite segmente ale VS, în 8,3% – apariția modificărilor (în repaus ele neexistând), în 8,3 % din cazuri – reapariția lor alături de cele existente deja. Dispariția defectelor perfuziei miocardului VS la bolnavii cu CMD, ca răspuns la introducerea dipiridamolului, demonstrează, probabil, prezența la aceştia a arteriolospasmelor funcționale, ca urmare a hiperreactivității vaselor coronariene.

Scanned with OKEN Scanner

Modificări similare s-au depistat şi la majoritatea bolnavilor cu MC; totuşi, în acest caz, micşorarea defectelor perfuziei se pare că a fost condiționată de nivelarea fluxului sanguin intramiocardic în segmentele miocardului cu hiperemie inflamatoare a vaselor în repaus, cu segmentele miocardului neinflamat şi cu arterele dilatate maximal după introducerea dipiridamolului.

Sub influența dipiridamolului, apariția sau accentuarea defectelor perfuziei miocardului ventriculului stâng la bolnavii cu CMD, este condiționată, probabil, de sindromul "furtului", ca urmare – după cum s-a arătat mai sus – a tonusului ridicat al arterelor coronare şi a modificărilor lor organice în segmentele cardioscrelozei micro- şi macrofocală.

Datele expuse certifică modificările – atât morfologice, cât şi funcționale – din vascularizația miocardului la bolnavii cu CMD, la toate nivelurile, ceea ce confirmă prezența la aceştia a hipoxiei cronice (ischemiei) miocardului şi rolul său în lezarea primară şi/sau secundară a cardiomiocitelor. O dovadă a acestui fapt o reprezintă şi studierea intravitală a bioenergeticii miocardului la CMD, efectuată de noi.

După cum se vede din *Tabelul 7*, creşterea vitezei respirației mitocondriale a cardiomiciteloor

Scanned with OKEN Scanner

(Δ%) prin stimularea ADP şi a creatinei la bolnavii CMD cu IC CF – III-IV (NYHA), este sigur mai scăzută decât la IC CF – I-II (NYHA), ceea ce demonstrează o hipoxie a miocardului mai pronunțată la bolnavii cu modificări funcționale şi morfologice grave ale inimii.

Tabelul 7. **Indicii respirației mitocondriale a cardiomiocitelor la bolnavii cu CMD în funcție de stadiul insuficienței circulației sanguine**

	IC *CF* – III (NYHA)	IC *CF* IV (NYHA)	EXACTITATEA DIFERENȚELOR p
VITEZA BAZALĂ *a respirației mitocondriale Vong atom O/min/mg greutate uscată*	1,91 ± 0,29	3,86 ± 0,23	< 0,001
VITEZA *respirației ADP-stimulate0,1 mM ADPVADPng atom/min/mg greutate uscată*	3,77 0,47	5,13 ± 0,32	< 0,02
Δ %	119,1 ± 30,3	33,1 ± 2,8	< 0,01
VITEZA *respirației creatin-stimulate 30 mMVCRng atom 0/min/mg greutate uscată*	7,38 ± 0,73	7,05 ± 0,42	*NS*
Δ %	95,8 ± 3,2	37,7 ± 1,1	< 0,001
VITEZA MAXIMĂ *a respirației ADP-stimulate 1 mM ADP Vmaxng atom 0/min/mg greutate uscată*	10,72 ± 0,46	8,77 ± 0,50	< 0,01
Δ %	61,0 ± 23,9	24,9 ± 3,2	*NS*

Scanned with OKEN Scanner

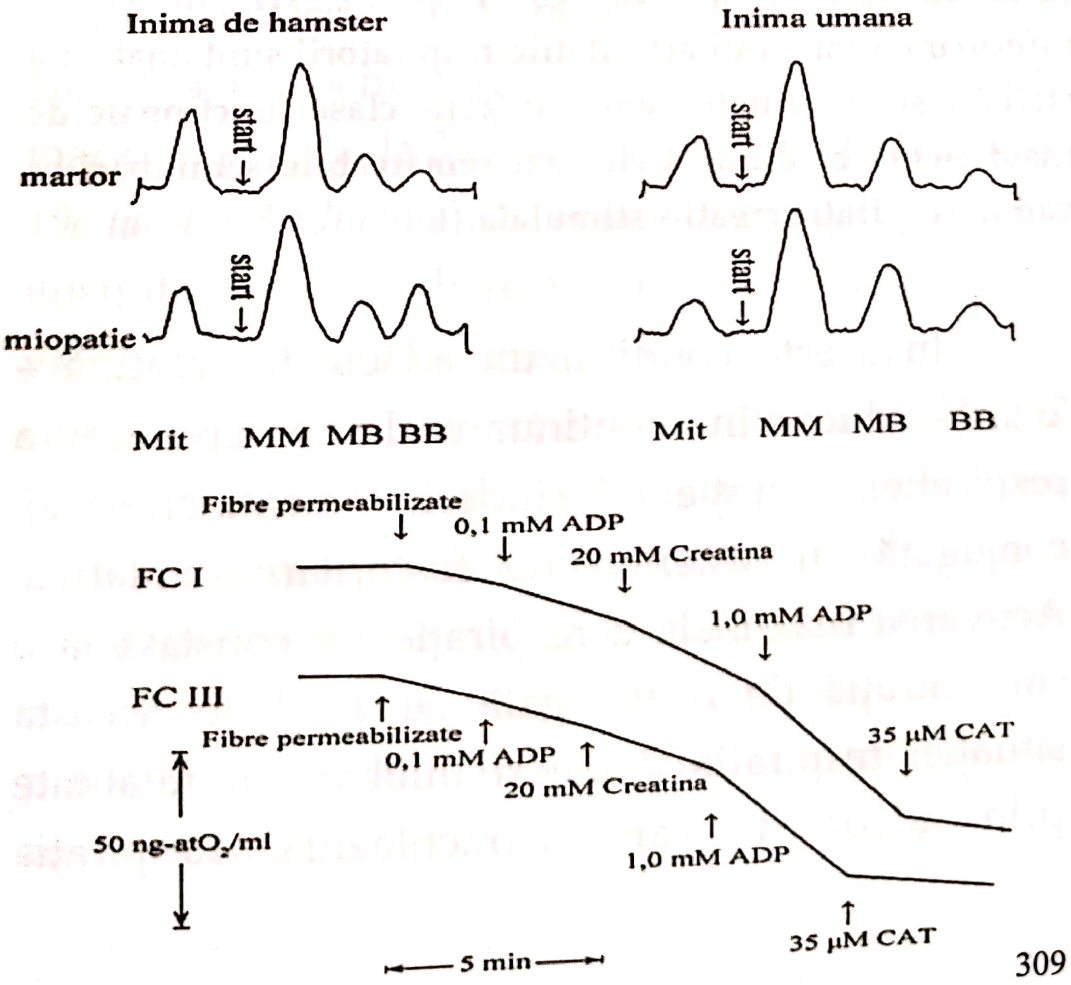
INHIBAREA *respiraţiei ADP-stimulatede carboxiatractilozid (CAT) ng atom 0/min/mg greutate uscată*	3,05 ± 0,65	2,96 ± 0,45	*NS*
Δ %	- 72,5 ± 5,8	- 66,5 ± 4,1	*NS*
Vmax / Vo	2,27 ± 0,17	1,52 ± 0,08	< 0,001

În studiul de faţă am cercetat de asemenea modificările spectrale ale izofermentului creatinchinazei în inima umană, folosind mostre obţinute în timpul transplantului de cord – inimile primitorilor şi eşantioane de biopsie subendomiocardică, prelevate în timpul coronaroventriculografiei. Prin comparaţie cu *martorul*– inimile donatorilor, prelevate pentru transplant, dar neîntrebuinţate pe criterii imunologice – în inimile bolnavilor cu cardiomiopatie dilatativă CF III scade brusc conţinutul procentual de creatinchinază mitocondrială şi cresc cotele subunităţilor-*B* (*BB*- sau *MB*-izofermentul) (*Figura 19*A, partea de sus).

Scăderea activităţii creatinchinazei totale este dată, cel mai probabil, de conţinutul redus în ţesut al cardiomiocitelor indemne şi de creşterea conţinutului fibros. În acelaşi timp, însă, modificarea spectrală a fermentului şi a cotei relative a diverşilor săi izofermenţi reflectă perturbările în sistemele de fermenţi intracelulari şi

Scanned with OKEN Scanner

în expresia unor fermenți, în particular. Conținutul redus al creatinchinazei mitocondriale, ar trebui, logic, să determine o scădere a eficacității acceptorului de control în mitocondriile inimilor cardiomiopatice. Această supoziție este confirmată de înregistrarea respirației tisulare în eşantioanele de biopsie subendomiocardică. În *Figura 19B*, partea de mijloc sunt ilustrate înscrierile absorbției de oxigen de către fibrele preparate cu saponină, izolate din inimile pacienților cu insuficiență cardiacă, cu diverse clase funcționale. Se observă că, la adaosul de 0,1μ*MADP*, respirația se activează parțial, din cauza dereglării difuziei adenozin difosfatului [161].



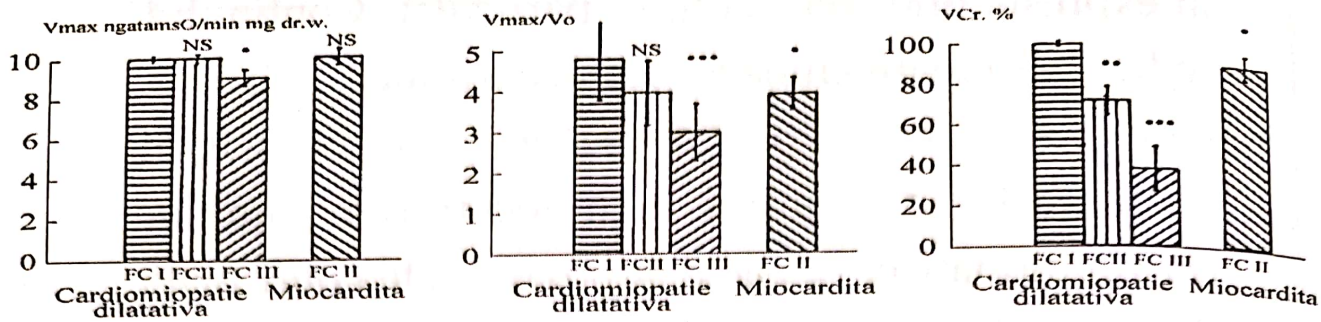


Figura 19. **Analiza profilurilor izoenzimei creatinchinazei şi respiraţia tisulară în mostrele de biopsie, de la indivizi sănătoşi şi cardiomiopatici, prelevate în timpul coronaroventriculografiei. În partea superioară sunt prezentate profilurile izoenzimei creatinchinazei pentru inimile umane intacte (de control) şi cardiomiopatice, respectiv. În partea din mijloc sunt învederate curbele respiraţiei mitocondriale în fibrele permeabilizate cu saponină pentru inimile pacienţilor suferinzi de cardiomiopatie dilatativă, CF I şi CF III. În partea inferioară a imaginii activităţile respiratorii sunt analizate statistic şi prezentate pentru diferite clase funcţionale de insuficienţă cardiacă. Cele mai remarcabile schimbări se văd în respiraţia creatin-stimulată.**

În aceste condiţii, un adaos de creatină – 20μM– duce în continuare la o creştere a respiraţiei, graţie includerii creatinchinazei, conjugată cu sistemul de fosforilare oxidativă. Activarea maximală a respiraţiei se constată la o concentraţie de *ADP* egală cu 1μM; în această situaţie, respiraţia poate fi inhibată în totalitate prin adaos de carboxiatractilozidă. Respiraţia

Scanned with OKEN Scanner

mitocondrială este controlată de adeninnucleotid-translocază, ceea ce denotă că integritatea membranei mitocondriale nu este afectată.

Creatina stimulează respirația în mod diferit, în funcție de *CF* a insuficienței cardiace, în dependență de eficiența creatinchinazei mitocondriale (*Figura 19*C, partea de jos). Indicii respirației maximale s-au deosebit nesemnificativ la bolnavii cu CF II şi CF III şi nu există nici o diferență între CF II şi CF I. De remarcat gradul înalt de reproducere a datelor în interiorul uneia şi aceleaşi grupe: datele diferă între ele cu mai puțin de 10%. Diferențe importante, însă, au fost relevate în valorile respirației creatin-stimulate: valoarea relativă a acestui parametru s-a modificat de la 108,3± 4,4% pentru CF I – luată de noi drept martor – şi până la 36,5 ±1,2% pentru CF III (*Figura 19c tabelul 8 Khuciua*). În *Figura 19c* şi *tabelul 8* este ilustrată corelarea directă între fracția de ejecție şi valoarea respirației creatin-stimulate, la fel şi corelarea, invers proporțională,dintre acest indiciu şi presiunea terminal-diastolică. În acest fel, micşorarea cotei creatinchinazei mitocondriale şi a respirației creatin-stimulate în miocardul bolnavilor cu cardiomiopatie dilatativă depinde, cel mai probabil, de gradul modificărilor funcționale ale acestor patologii.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8. **Caracteristicile clinice ale funcțiilor cordului, hemodinamica centrală şi parametrii respiratorii în fibrele cardiace permeabilizate ale pacienților cu cardiomiopatie dilatativă**

Parametri	CF I	Clasa funcțională IC NYHA CF II	CF III
Vârsta medie, ani	31.3 ±6.9	39.1 ±2.4	32.8 ±3.6
Volumul terminal diastolic, ml VS VD	 101 ±11 89 ±12	 118 ±6 101 ±5	 226 ±18 186 ±13
Fracția de ejecție VS VD	 0.44 ±0.04 0.42 ±0.02	 0.41 ±0.02 0.42 ±0.02	 0.24 ±0.01 0.29 ±0.02
Presiunea terminal diastolică, mmHg VS VD	 6.67 ±1.48 2.67 ±0.41	 12.2 ±1.4 5.4 ±0.45	 25.7 ±1.8 11.5 ±1.2
Ratele respirației în fibrele permeabilizate: a. Cr – stimulată în % din care în prezența a 100 µm ADP b. Maximală, ng atomide O_2/ mg d.w.	 108 ±4.4% 10.91 ±1.3	 89.5 ±2.14% p<0.01 108 ±0.17 N.S	 36.5 ±1.95% p<0.01 8.59 ±0.34 p<0.05

La o analiză detaliată a comportării mitocondriilor în fascicule de fibre tratate cu saponină – la care membrana celulară externă a fost înlăturată – , am observat că aceste mitocondrii îşi păstrează în totalitate proprietățile, dar pentru activarea

Scanned with OKEN Scanner

respirației lor complete sunt necesare concentrații de *ADP* de zece ori mai mari, cerute de dificultatea difuziei intracelulare, din cauza conjugării intermediare cu structuri celulare, cum ar fi actina şi miozina [163]. Scăderea sensibilității la *ADP* în aceste mostre permite evaluarea eficienței funcționării creatinchinazei în mitocondrii: adaosul de creatină, pe fond de $0{,}1\mu MADP$, activează respirația grație declanşării reacțiilor de conjugare a sintezei de fosfocreatină şi a fosforilării oxidative. Indicele relativ al activării respirației, în aceste condiții, poate fi considerat drept parametru al eficacității reacțiilor de conjugare. Datele acestui studiu atestă că în cardiomiopatiile dilatative conținutul relativ al creatinchinazei mitocondriale scade de două ori, indicând prezența modificărilor bruşte în sistemul de biosinteză a diverşilor izofermenți.

În concordanță cu scăderea conținutului creatinchinazei mitocondriale scade şi eficiența transportului de energie pe rețeaua fosfocreatinică, ca dovadă servind scăderea bruscă a valorii respirației creatin-stimulate şi sinteza aerobă a fosfocreatinei în mitocondrii. Perturbările în sistemul de transportare a energiei sunt date, cel mai probabil, de creşterea semnificativă a presiunii terminal-diastolice şi de scăderea fracției de ejecție. Nu este clar, deocamdată, dacă aceste modificări

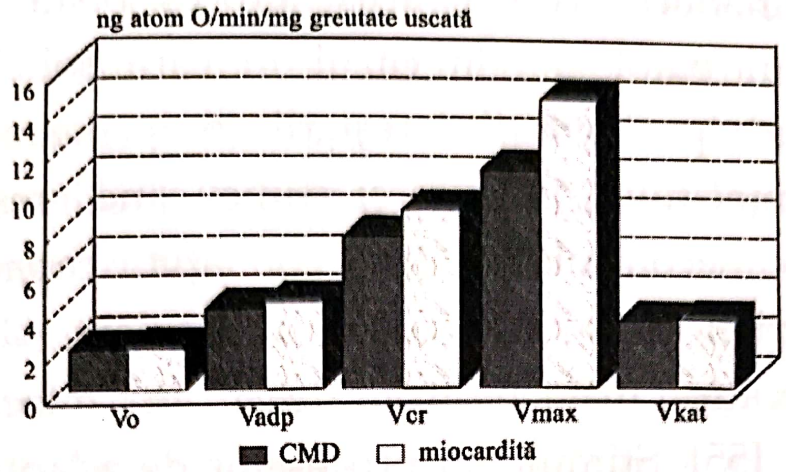
Scanned with OKEN Scanner

funcționale sunt consecința dereglării energeticii miocardului, a expresiei în sistemul creatinchinazei sau ele se prezintă ca manifestări adaptative. Presiunea terminal-diastolică mare în cardiomiopatia dilatativă poate fi explicată în parte prin rigiditatea sporită a miocardului, determinată de proliferarea în exces a fibrozei tisulare [9, 344]. În egală măsură, însă, presiunea poate fi cauzată de conținutul ridicat al *ADP*-ului miofibrilar, consecință a refosforilării lui reduse, condiționate de scăderea eficienței funcționării căii fosfocreatinice de transportare a energiei. După cum se ştie, *ADP*-ul se conjugă suficient de puternic cu miozina, în aceeaşi măsură cu inhibarea activității *ATP*-azei [125] şi disocierea punților transverse, ceea ce poate fi şi cauza avansării presiunii terminal-diastolice şi scăderea fracției de ejecție. Rezultatele acestui studiu arată că în cardiomiopatia dilatativă indicii respirației mitocondriale pot fi folosiți ca parametri relevanți, complementari,în evaluarea gravității bolii. Pentru elucidarea rolului scăderii expresiei şi al eficienții funcționării creatinchinazei mitocondriale, în patogenia cardiomiopatiei dilatative merită a fi făcute în continuare cercetări experimentale şi clinice detaliate.

Scanned with OKEN Scanner

Graficul 11

INDICII RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE A CARDIOMIOCITELOR LA BOLNAVII CU CMD ȘI MIOCARDITĂ CRONICĂ



4.4. HIPERTROFIA PATOLOGICĂ A MIOCARDULUI, ALTERĂRI MORFOLOGICE SPECIFICE ÎN CARDIOMIOPATIA DILATATIVĂ ASOCIATĂ CU FUNCȚIA SCĂZUTĂ A RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE CREATIN-STIMULATE

În ultimii ani, s-au depus eforturi uriaşe în direcția stabilirii mecanismelor moleculare ale hipertrofiei miocardului. Hipertrofia celulei reprezintă un proces de mărire a dimensiunilor ei, proces însoțit de creşterea nivelului sintezei proteice generale, întărirea citoscheletului, modificarea expresiei unei serii de gene şi, nu rare ori, de mărirea ploidiei. Hipertrofia multor tipuri de celule se produce normal în procesul dezvoltării embrionare şi al creşterii organismului şi, de asemenea, însoțeşte o serie de stări patologice.

Scanned with OKEN Scanner

Hipertrofia miocardului este răspunsul de adaptare a țesutului cardiac la suprasolicitările hemodinamice. Totuşi, acest proces poate trece într-unul patologic, în cazul în care solicitarea depăşeşte posibilitățile creşterii compensatoare a cardiomiocitului, precum şi atunci când creşterea devine necontrolată, iar corelația capacității contractile cu masa fibrei musculare devine semnificativ mai redusă decât în miocardul sănătos [55]. Stimularea proceselor de adaptare şi frânarea hipertrofiei patologice reprezintă o sarcină importantă în soluționarea problemei luptei cu insuficiența cardiacă. Pentru aceasta este necesar în special să ne imaginăm ce evenimente au loc la nivelul aparatului locomotor intracelular al cardiomiocitelor în hipertrofie.

Citoscheletul cardiomiocitelor include sistemul contractil actomiozinic, strict normalizat şi citoscheletul de sprijin, nu mai puțin organizat, alcătuit din microtubi şi filamente intermediare. La animale, hipertrofia cardiomiocitelor este însoțită de modificarea compoziției izoforme a unei serii de proteine structurale şi reglatoare. În modelele realizate pe animale, suprasolicitările cordului prin tensiune (coarctația aortică) s-a remarcat creşterea expresiei tubulinei şi desminei, care duc la mărirea rezistenței fibrelor, pe de o parte, şi la îngreunarea contracției actomiozinice, pe măsura acumulării de

Scanned with OKEN Scanner

proteine, pe de altă parte [378, 392, 418]. Modificări similare de expresie a tubulinei s-au depistat la bolnavii cu hipertrofie decompensată a miocardului, produsă de modificări stenotice ale aortei, adică de suprasolicitarea cordului prin tensiune [356]. La bolnavii cu CMD, s-a depistat un conținut ridicat de proteine ale filamentelor intermediare de desmină şi vimentină în miocard, conținut care are o corelație negativă cu contractilitatea fibrelor actomiozinice şi cu fracția de ejecție cardiacă [93]. În modele pe animale, izoforma de miozină MHCα „rapidă" a fost înlocuită cu izoforma lentă MHCβ, mai puțin eficientă; totodată, s-a observat reexpresia unor proteine structurale şi de semnalizare embrionară. Pentru miocard, astfel de proteine sunt proteine-activatori ai ciclului celular şi proteine contractile musculare netede sau nemusculare. Mult mai puțin înțeleasă este destinația altor reglatori proteici ai contractilității musculare ca, de exemplu, a produselor locusului genetic al chinazei lanțurilor uşoare de miozină (CLUM) şi a chinazei proteinei înrudite (CRP), descoperite, abia recent, în acest țesut. Este admis faptul că, în general, CLUM reprezintă reglatorul cheie al contracției muşchilor netezi şi al mobilității celulelor nemusculare. Rolul ei constă în activarea motorului molecular principal al celulelor

Scanned with OKEN Scanner

musculare netede şi nemusculare – miozina de tip II [388]. CLUM fosforilează lanțurile uşoare de miozină şi, astfel, stimulează activitatea ei ATP-azică. Un al doilea efect al fosforilării îl reprezintă asamblarea moleculelor miozinice în filamente. CLUM activată şi miozina asamblată în filamente capătă capacitatea de a interacționa productiv cu actina şi de a dezvolta capacitatea de efort. Proteina CRP nu poate dezvolta activitatea proteinchinazică a CLUM. Unica țintă moleculară cu caracteristici cunoscute a acestei proteine este miozina de tip II. CRP se leagă de miozina nemusculară şi musculară netedă şi îi stabilizează starea filamentară [367]. Astfel, CRP reproduce parțial acțiunea CLUM asupra miozinei, stimulează filamentarea miozinei şi, totuşi, nu duce la activarea miozinei. În virtutea faptului că CRP concurează cu *CRP-domain* CLUM pentru fixarea de miozină, ea este capabilă să influențeze viteza de fosforilare a miozinei de către acest ferment şi să regleze procesul de activare a miozinei [97]. În experiențele pe fibremusculare netede permeabilizate, s-a arătat direct că adăugarea de CRP exogenă duce la relaxarea fibrei [74]. La ora actuală încă nu se ştie dacă aceasta se produce ca urmare a inhibării activității CLUM sau pe seama unui alt mecanismoarecare.

Scanned with OKEN Scanner

CLUM musculară netedă/nonmusculară şi CRP se exprimă, de asemenea, şi în inima animalelor şi în cordul uman [74, 97, 367].

Conținutul ridicat de CRP în cardiomiocitele embrionare ale păsărilor şi nivelul ei scăzut în inima animalului matur permite să presupunem participarea acestei proteine în cardiogeneză. Este logică supoziția că procese similare se produc şi în cordul uman în embriogeneză şi, de asemenea, în hipertrofia patologică a miocardului în perioada postnatală. Este de aşteptat ca în toate aceste situații cardiomiocitele să răspundă la sarcina hemodinamică ridicată, prin creşterea sintezei proteinelor contractile şi prin adunarea lor în sarcomeri. Probabil, pentru înfăptuirea *de novo* a sarcomerogenezei în hipertrofia cardiomiocitelor la bolnavii cu CMD se vor activa aceleaşi mecanisme moleculare care au funcționat în cordul embrionar şi este de aşteptat o creştere a expresiei CLUM şi a CRP în inimă pentru asigurarea acestui proces. Asemenea ipoteză este în acord cu faptul stabilit, că profilul expresiei proteice a miocardului, care se hipertrofiază, se caracterizează prin revenirea parțială spre fenotipul embrionar.

Rezultatele determinării conținutului CLUM, CRP şi ale altor proteine în miocardul bolnavilor cu CMD relevă următoarele:

Scanned with OKEN Scanner

- în mostrele de miocard prelevate de la bolnavii cu CMD, studierea expresiei proteinelor–*markeri* ai hipertrofiei miocardului a evidențiat creşterea conținutului de tubulină, în medie, la 42%, de desmină – la 33% şi de beta-izoformă a miozinei scheletale – la 20%;
- înregistrarea, în miocardul bolnavilor cu CMD, a expresiei proteinelor musculare netede – markerii stării embrionare a miocitelor – actina-alfa musculară netedă şi SM22 – expresia lor s-a dovedit crescută, în medie, de 1,5 ori;
- la toți bolnavii cu CMD s-a observat un conținut de CRP mărit, în medie, la 52% şi de CLUM – la 70%; astfel, în miocardul investigat al bolnavilor cu CMD, s-a constatat hipertrofia unei părți importante de cardiomiocite cu revenire parțială la programul fetal al expresiei proteinelor, program însoțit de creşterea expresiei CRP şi CLUM;
- introducerea oligonucleotidului antisens în celule a inhibat sinteza CRP *de novo* stimulată de endotelină sau de factorii serici;
- s-a dovedit, că, în cultura de control a celulelor, CM, cu discurile-Z formate au

Scanned with OKEN Scanner

constituit 79% din numărul total de CM, iar, printre celulele cu translare blocată a CRP, acestea s-au dovedit mai puține de 40% din numărul total; adică formarea structurii sarcomerilor a fost blocată.

În prezenta lucrare ne-am oprit asupra aspectelor biochimice ale hipertrofiei cardiomiocitelor în CMD, şi anume asupra modificării compoziției proteice a acestor celule. În țesutul cardiac matur, solicitarea mecanică asupra miocitelor produce eliberarea, de către cardiomiocite, a factorilor de creştere şi stimularea autocrină a expresiei unei serii de gene ce realizează fenotipul hipertrofic. Activarea expresiei proteinelor structurale şi motoare reprezintă răspunsul compensator al celulei, care necesită întărirea citoscheletului şi a aparatului contractil. Totuşi, creşterea sintezei unei serii de proteine citoscheletice poate duce, cu timpul, la modificări patologice. Avansarea nivelului expresiei izoformelor de tubulină, a componenților principali ai microtuburilor şi a proteinei filamentelor intermediare ale desminei la animale, duce, inițial, la sporirea rigidității şi rezistenței microfilamentelor, care comportă o suprasolicitare mecanică, şi reprezintă un proces adaptativ. Totuşi, pe măsura acumulării acestor proteine în

Scanned with OKEN Scanner

celulă, începe să crească vâscozitatea sarcoplasmei ce înconjoară structurile actomiozinice funcționale. Ca urmare a acestui fapt, procesul de avansare a filamentelor de miozină, în raport cu cele de actină, se îngreunează şi eficiența contracției scade [392, 418]. Astfel, o creştere substanțială a conținutului de tubulină şi desmină, observată la respectiva investigație de CMD, poate să condiționeze, parțial, caracterul neadaptativ al hipertrofiei cardiomiocitelor, când, în pofida măririi dimensiunii fibrelor funcționale, eficiența contracției se dovedeşte a fi redusă.

Pe mostre de hipertrofie a miocardului de la animale, s-a văzut că introducerea agenților ce contribuie la depolimerizarea tubulinei a îmbunătățit parametrii de contractilitate a cardiomiocitelor [191]. Creşterea expresiei tubulinei, depistată de noi în miocardul bolnavilor cu CMD, ne permite să presupunem că, în cazul acestei boli, abordări similare pot fi utilizate pentru elaborarea unor noi metode de corecție a contractilității cardiace scăzute.

Pe lângă mărirea expresiei proteinelor structurale, deja existente în hipertrofia miocitelor, se poate produce schimbul de izoforme ale proteinelor contractile, care se deosebesc prin proprietățile lor. Astfel, în miocardul hipertrofic al animalelor, izoforma MHCα, mai eficientă, este

Scanned with OKEN Scanner

înlocuită aproape complet de izoforma MHCβ [1, 220].

Conform datelor noastre, în miocardul bolnavilor cu CMD se produce, de asemenea, mărirea conținutului de MHCβ, în medie, cu 21%. La om, MHCβ alcătuieşte 80-90% din conținutul general de izoforme scheletale de miozină în inimă, de aceea, creşterea conținutului ei poate semnifica, practic, înlăturarea izoformei MHCα „rapide", mai eficiente, din structurile contractile. Activitatea ATP-azică, mai redusă a MHCβ la asemenea schimbări, poate deveni unul din factorii care condiționează o contractilitate cardiacă redusă. Probabil, menținerea expresiei izoformelor mai eficiente ale proteinelor contractile poate fi privită drept una din căile de corecție a funcției cardiace reduse, în CMD. Astfel, recent, s-a afirmat că ameliorările funcționale la bolnavii cu CMD, în aplicarea terapiei cu blocanții β-adrenoreceptorilor, poate fi condiționată inclusiv de restabilirea echilibrului izoformelor lanțurilor grele de miozină MHCα şi MHCβ [241].

Aşadar, în mostrele investigate ale miocardului bolnavilor cu CMD, conținutul proteinelor-*markeri* ai hipertrofiei (tubulină, desmină, MHCβ) s-a dovedit în mod sigur crescut, ceea ce concordă perfect cu tabloul clinic şi histologic al hipertrofiei unei părți însemnate de

Scanned with OKEN Scanner

cardiomiocite în CMD. Accentuarea exagerată a expresiei proteinelor citoscheletale indicate poate condiționa caracterul neadaptativ al hipertrofiei cardiomiocitelor.

Deosebit de interesante sunt datele privind faptul că, în inima suprasolicitată funcțional a animalelor, se produce sinteza proteinelor miocardice embrionare, ceea ce indică similitudinea mecanismelor hipertrofiei şi ale cardiogenezei normale. Dintre genele embrionare fac parte, în primul rând, unele gene cu răspuns precoce, precum genele c-Jun şi o serie de proteine musculare netede şi nemusculare, de exemplu, actina-α musculară netedă [43, 296]. Se consideră că proteinele musculare netede participă la formarea matricelor aşa numitelor premiofibrile, pe care se produce asamblarea sarcomerilor – unitățile elementare contractile ale cardiomiocitelor [84]. Creşterea expresiei actinei-α musculare netede a fost observată la pacienții cu CMD [2]. Cercetările noastre au demonstrat creşterea conținutului de actină-α musculară netedă în miocardul bolnavilor cu CMD. Mai mult, pe lângă această proteină, conținutul altor proteine musculare netede – SM22, CLUM şi CRP – a fost, de asemenea, crescut semnificativ în CMD, în comparație cu norma, ceea ce permite să

Scanned with OKEN Scanner

presupunem participarea lor la evoluția hipertrofiei cardiomiocitelor.

Proteinele CLUM şi CRP sunt produşi alternativi ai *locus*-ului CLUM în genomul vertebratelor [41]. Gena CRP se află în interiorul genei CLUM, iar succesiunea aminoacizilor în CRP este identică cu succesiunea domeniului C-final al chinazei. CLUM este descoperită în toate celulele şi țesuturile organismului şi participă la reglarea diverselor forme de mobilitate, precum contracția muşchilor netezi, secreția, citochineza şi altele. În ultimul timp au apărut comunicări ştiințifice privind participarea CLUM la formarea sistemului contractil al muşchilor cu striații transversale, inclusiv al cardiomiocitelor [15]. Totuşi, detaliile acestui proces rămân încă nestudiate. Se poate presupune că, la sarcomerogeneza *de novo*, care apare la hipertrofierea cardiomiocitelor, în caz de CMD, CLUM joacă acelaşi rol ca şi în maturarea miofibrilelor în inima embrionară. Funcția de bază a CLUM în celule constă în activarea motorului molecular al miozinei de tip II, prin fosforilarea lanțurilor ei uşoare, de reglare. Ținta posibilă a CLUM în cardiomiocite poate fi miozina nemusculară, care intră în componența premiofibrilelor, alături de alte proteine nemusculare şi musculare netede [84, 239]. Unul dintre rezultatele fosforilării miozinei CLUM îl

Scanned with OKEN Scanner

reprezintă asamblarea în filamente. Probabil, tocmai starea filamentară a miozinei este necesară pentru stabilirea structurii premiofibrilelor.

Pe lângă aceasta, miozina nemusculară este depistată în zona discurilor-Z ale miofibrilelor mature [380], ceea ce presupune participarea lor activă la contractarea cardiomiocitelor. O posibilă funcție a CLUM, în acest caz, poate fi întărirea structurii discului-Z, care suportă o sarcină semnificativă în momentul contractării. Activarea motorului miozinic în componența discului-Z poate realiza o compactizare suplimentară a acestei structuri. Caracterul compact şi rezistența discului-Z, la rândul lor, pot avea un aport substanțial la eficiența contracției miocardului.

Spre deosebire de CLUM, expresia CRP este limitată de muşchii netezi şi de cardiomiocite, conținutul ridicat al acestei proteine în inima embrionară a păsărilor şi, practic, completa ei absență la animalul matur [41], permite să presupunem participarea CRP la cardiomiogeneză.

Pentru verificarea ipotezei enunțate *supra*, despre rolul posibil al CRP în sarcomerogeneză, noi am scăzut conținutul său în CM, oprindu-i translația cu oligonucleotidul specific antisens. Majoritatea cardiomiocitelor, prelucrate antisens de oligonucleotid, au conținut, în special, premiofibrile, fracțiunea de celule diferențiate a

Scanned with OKEN Scanner

alcătuit 36%, în timp ce, în grupa de control CM, cu discurile-Z formate, au constituit 79%.

Astfel, urmărind tulburarea maturării sarcomerilor prin blocarea translației CRP în CM cu ajutorul oligonucleotidului antisens, am descoperit, că CRP este o verigă importantă în lanțul evenimentelor care duc la asamblarea sarcomerului matur. În concordanță cu modelul Dabiri G. A. [84] şi cu rezultatele grupului Adelstein R. S. (Takeda K. şi alții) [380], miozina nemusculară este unul din participanții centrali ai asamblării structurilor presarcomere şi ai susținerii, pe mai departe, a integrității aparatului contractil. La scăderea conținutului de miozină nemusculară, s-a observat tulburarea structurii filamentelor, iar distribuirea lor a devenit neregulată. S-au produs edematierea citoplasmei şi hipertrofia cardiomiocitelor.

În felul acesta, creşterea expresiei CRP în cardiomiocite sub influența factorilor umorali şi stimularea mecanică sunt în acord cu datele privind necesitatea existenței acestei proteine în procesul de maturare a aparatului lor contractil [97] şi indică participarea CRP la procesele compensatoare şi patologice ale miocardului la bolnavii cu CMD.

Creşterea expresiei CRP la bolnavii cu CMD a fost demonstrată, pentru întâia oară, de către noi.

Scanned with OKEN Scanner

Este necesar să remarcăm că, în mostrele de animale, lezarea miocardului produsă de izoproterenol şi de antibioticul adriamicină, se observă şi creşterea expresiei acestei proteine în stadiul de reparație [98]. Probabil, în aceste mostre procesele cu rol de reparare în miocard au inclus, printre altele, şi hipertrofia cardiomiocitelor, ceea ce s-a reflectat asupra spectrului proteinelor exprimate în ele.

În toate cazurile analizate, drept semnal inițial de mărire a expresiei CRP poate servi neconcordanța dintre sarcina hemodinamică asupra inimii şi posibilitățile ei contractile. Investigațiile structurii promotorului genei CRP confirmă acest punct de vedere. S-a demonstrat că promotorul CRP conține elementul CArG, care răspunde la factorii de creştere (SRE) şi la stimularea mecanică; anterior a fost subliniată necesitatea fixării de către acesta a factorului SRE, pentru transcripția eficientă a CRP în celulele liniei A10 [148].

Astfel, se poate presupune că intensitatea sporită a expresiei proteinelor studiate, în miocardul bolnavilor cu CMD, reprezintă răspunsul cardomiocitelor la sarcină prin dilatare şi este condiționată de necesitatea creşterii elasticității şi a structurării aparatului lor locomotor. Expresia ridicată a proteinelor

Scanned with OKEN Scanner

musculare netede, caracteristice pentru perioada embrionară de evoluție a inimii normale, reflectă revenirea parțială a cardiomiocitelor bolnavilor cu CMD la programul fetal al expresiei proteice, program al cărui sens constă, în special, în asigurarea miofibrilogenezei suplimentare. Creşterea substanțială şi reproductibilitatea conținutului de CRP şi CLUM în miocardul bolnavilor cu CMD permit să considerăm aceste proteine ca posibili *markeri* în diagnosticul hipertrofiei patologice a miocardului şi ca ținte moleculare potențiale în elaborarea de noi abordări ale tratamentului acesteia [50, 51].

În studiul următor vom relata aspecte particulare ale alterărilor morfologice ale miocardului la pacienții cardiomiopatici cu funcția celulară a creatinchinazei măsurată în mostrele biopsiilor endomiocardice obținute la cateterizarea cardiacă.

Mostrele de biopsie subendomiocardică de ventricul stâng au fost obținute în timpul coronaroventriculografiei la 43 de pacienți (37 bărbați şi 6 femei, cu vârsta medie 34 ± 8,6 ani) cu CMD.

Secțiuni ultrasubțiri au fost examinate cu microscopul electronic „JEM - 100 C". Au fost evaluați următorii indici morfometrici:

Scanned with OKEN Scanner

* fracția volumului țesutului fibros
* diametrul miocitului
* suprafața nucleară
* procentul nucleu / sarcoplasmă
* coeficientul de iregularitate a nucleului

Ultimul a fost calculat după formula: p2/4nS, unde p este perimetrul nuclear, S – mărimea nucleară, n = 3,14.

Pentru determinarea parametrilor respirației mitocondriale, mostrele de biopsie au fost tratate cu saponină (49 µg/ml) pentru distrugerea (permeabilizarea) sarcolemei, iar ritmul respirației a fost determinat cu un electrod Clark într-o celulă oxigrafică, aşa cum s-a arătat mai sus, în acest capitol.

Datele clinice şi morfologice sunt prezentate în *Tabelele 9 şi 10.*

Tabelul 9. **Date clinice de la 43 de pacienți cu cardiomiopatie dilatativă**

PACIENȚI	SEX (M/F)	VÂRSTA MEDIE (ani)	CF NYHA	DURATA BOLII(luni)
			I II III IV	
Grupa I:13	12/1	31±8,4	0 1 6 6	38±21

Scanned with OKEN Scanner

Vârsta(ani)		19-46		2–144
Grupa II: 30	25/5	36+9,0	2 7 13 8	28±24
Vârsta (ani)		21-56		3–120
Total: 43	37/6	34±8,6	2 8 19 14	33±22

Tabelul 10. **Date histologice ale mostrelor prelevate prin biopsie de la 43 de pacienți cu cardiomiopatie dilatativă**

	Grupa 1 (n = 13)% (n)	Grupa 2 (n = 30)% (n)	Total (n = 43)% (n)
Nuclei anormali	100/13	0	31/13
Hipertrofia cardiomiocitelor: moderată medie gravă	15/2 15/2 69/9	56/17 16/5 3/1	44/17 16/7 23/10
Fibroză: difuză de focar	38/5 31/4	63/19 68/18	56/24 51/22
Modificări endocardice: fibroză elastoză	69/9 15/2	80/24 23/7	79/34 21/9
Trombi	23/3	27/8	25/11
Celule musculare netede	46/6	27/8	32/14

Scanned with OKEN Scanner

Studiul morfometric a arătat caracteristici variabile ale cardiomiocitelor. Alterarea caracteristicilor lor celulare,precum şi suprafaţa acestora variază în linii mari la întregul grup de pacienţi. La câţiva dintre ei s-a observat un şablon caracteristic de nuclei bizari şi supradimensionaţi cu niveluri marcat crescute ale convoluţiilor membranare (*Figurile 20A* şi *B*).

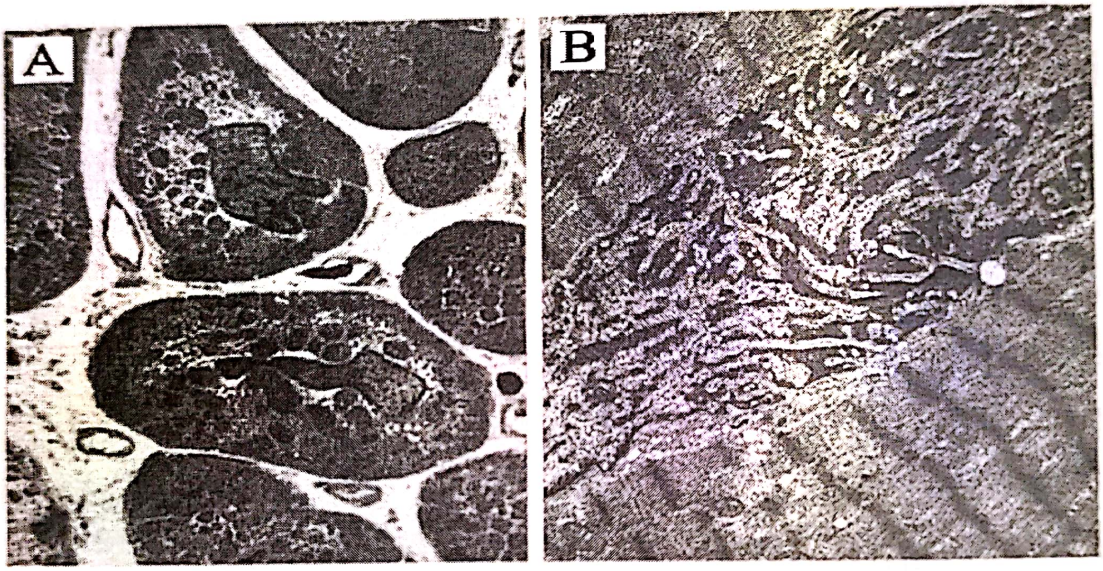


Figura 20. **Aspecte hipertrofice, gigantice şi bizare ale nucleilor în miocitele hipertrofice. A - secţiune plastică, x 1100. B - microscopie electronică, mărire: x 6000**

Pacienţii de la care au fost obţinute aceste mostre au fost selectaţi în grupa I (n = 13), restul pacienţilor constituind grupa II (n = 30). Diametrul miocitului şi suprafaţa nucleară în grupa I-a au fost semnificativ mai mari decât în grupa a II-a (*Tabelul 11*).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11. **Indici morfometrici, parametri mitocondriali respiratori şi date hemodinamice la bolnavii cu CMD**

Parametri	Grupa I	Grupa II
Diametrul miofibrilelor (mcm)	30±4	23±3
Suprafaţa nucleilor (mcm²)	57±5	42±6
Indicele formelor nucleare	2,25±0,13	1,75±0,11
Coeficientul nucleu/sarcoplasmă	0,045±0,004	0,028±0,003
% - respiraţie Cr-stimulată	36±4	90±12
FE VS	0,23±0,03	0,4±0,08
IVTD VS (ml/m²)	231±59	121±29
PTD VS (mm Hg)	23±7	10±4

De asemenea, procentul nucleu/ sarcoplasmă şi factorul de formă nucleară au fost mai mari în grupa I. Alterările degenerative ale nucleilor, adică ruperea cromatinei şi liza nucleolemei au fost observate la 4 pacienţi din grupa I. La 5 cazuri din acelaşi grup s-a observat suprafaţa mitocondrială mult mărită, ce ocupă mai mult de 50% din suprafaţa miocitului şi domină suprafaţa miofibrilară (Figura 2A şi B). În schimb, fibroza interstiţială a fost similară în ambele grupuri.

La câteva inimi cu cardiomiopatie s-a făcut analiza electroforetică a fracţiei totale de creatinchinază extrasă din ţesutul omogenizat şi

Scanned with OKEN Scanner

s-au constatat alterări semnificative în expresia izoenzimelor creatinchinazei. Miocardul bolnav a avut un conținut mediu mai mic de creatinchinază şi un conținut mai mare de MB în comparație cu miocardul sănătos.

Această alterare sugerează că insuficienta transformare a energiei datorată activității defectuoase a creatinchinazei mitocondriale poate apărea în miocardul bolnav. În fapt, ritmul foarte mic al respirației după adăugarea creatinei s-a constatat în grupa I, spre deosebire de grupa a II-a (*Tabelul 11*).

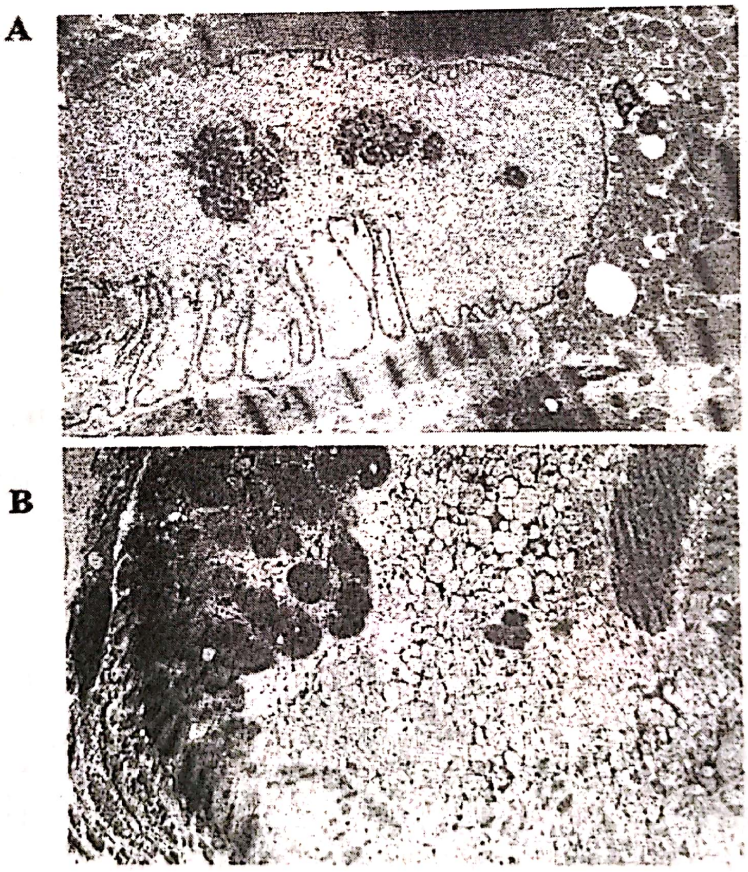


Figura 21. **A – Convoluțiuni nucleare şi nucleoli hipertrofici, microscopie electronică, x 5000. B – Mitocondria ocupă aproape întreaga porțiune a miocitului, microscopie electronică Mărire: x 4000**

Scanned with OKEN Scanner

Între grupele de aceeaşi vârstă (*Tabelul 9*) nu s-a constatat nici o diferenţă semnificativă; totuşi, pacienţii din grupa I au avut, simţitor, o mai lungă durată a bolii şi aproape toţi au aparţinut claselor III-IV (NYHA). Mai multe diferenţe au fost notate între grupele de evaluare a funcţiei contractile cardiace. Inimile din grupa I au demonstrat o presiune terminal-diastolică ventriculară stângă şi un index de volum semnificativ mai mari, concomitent cu scăderea fracţiei de ejecţie. (*Tabelul 11*). Şi parametrii funcţiei contractile şi indicii morfometrici care arată hipertrofia celulară se corelează cu o mărire a respiraţiei creatin-stimulate.

Cardiomiopatia dilatativă, cu o vizibilă hipertrofie a cardiomiocitelor şi nucleilor, poate să evolueze în forme de boală postvirală sau ereditară. Cu ceva timp în urmă, s-a consemnat prezenţa hipertrofiei pronunţate a cardiomiocitelor şi a macronucleilor cu forme neobişnuite [131, 324, 394]. Autorii au presupus că aceste modificări sunt caracteristice pentru cardiomiopatia dilatativă şi pot să o diferenţieze de formele secundare. Existenţa acestor particularităţi a fost utilizată, în cercetarea noastră, pentru a separa aceşti pacienţi într-o grupă aparte şi a studia particularităţile manifestărilor clinice ale CMD, în funcţie de caracterul şi gradul de exprimare a modificărilor

Scanned with OKEN Scanner

energetice ale miocardului pe materialul bioptatelor endomiocardice.

Am descoperit că în grupa respectivă de bolnavi conținutul relativ de creatinchinază mitocondrială scade de două ori, ceea ce indică grave modificări în sistemul biosintezei diferitor izofermenți. Urmare a scăderii conținutului de creatinchinază mitocondrială, scade considerabil eficiența transportării energiei pe calea fosfocreatinică, fapt demonstrat de scăderea bruscă a respirației creatin-stimulate şi a sintezei aerobe a fosfocreatinei în mitocondrii. Concomitent cu reducerea activității mitocondriale creatinchinazice, în inimă se produce creşterea conținutului de izoferment MB, ceea ce demonstrează modificarea expresiei genice a creatinchinazei,în cardiomiopatie. Trebuie să subliniem că tulburările din respirația mitocondrială sunt urmărite în aceeaşi zonă miocardiacă în care s-a efectuat şi analiza morfologică. Aceasta permite să presupunem că funcționarea defectuoasă a creatinchinazei mitocondriale poate fi primară în raport cu hipertrofia cardiomiocitelor.

După cum s-a evidențiat, activitatea specifică a izofermentului creatinchinazic mitocondrial, în majoritatea covârşitoare a investigațiilor cardiomiopatiilor experimentale, este mai redusă [404]. Funcția scăzută a creatinchinazei

Scanned with OKEN Scanner

mitocondriale a fost descoperită în investigațiile *in situ* ale respirației mitocondriale, la studierea cardiomiopatiilor animalelor [176, 327, 403]. Această modificare semnifică augmentarea adevăratei Km a fosforilării oxidante pentru ADP şi a vitezei mai reduse a purtătorului de ATP/ADP în membrana mitocondrială. Rezultatele noastre concordă cu opiniile altor cercetători [187], care au subliniat relația redusă PCr/ATP numai la pacienții CMD cu insuficiență cardiacă gravă. Funcția mitocondrială redusă a creatinchinazei se explică prin expresia modificată a fermentului [187] şi acumularea de Pi sarcoplasmatic [404] din cauza formării insuficiente a ATP. Cu toate acestea, activitatea fermentului se poate, în aceeaşi măsură, combina cu activitatea scăzută miofibrilară a ATP-azei în inima bolnavă [404]. Această supoziție este confirmată de micşorarea până la 57% a conținutului de creatină la bolnavii cu CMD investigați de noi, cu insuficiență cardiacă gravă şi hipertrofie pronunțată a cardiomiocitelor. Tulburările din sistemul transmiterii energiei, duc, probabil, la creşterea importantă a presiunii diastolice şi la scăderea fracției de ejecție. Creşterea presiunii terminal-distolice în CMD poate fi parțial pusă în relație cu scăderea compleanței miocardului, ținând de excesul țesutului conjunctiv. Totuşi, în mare măsură, aceasta poate fi

Scanned with OKEN Scanner

în legătură, de asemenea, cu mărirea ADP miofibrilar, din cauza micşorării refosforilării sale pe seama reducerii eficienței funcționării căii fosfocreatinice de transmitere a energiei. Se cunoaşte faptul că ADP este legat suficient de trainic de miozină,cu inhibarea concomitentă a activității ATP-azei şi cu disocierea punților transversale. Aceasta poate fi cauza creşterii presiunii terminal-diastolice şi a scăderii fracției de ejecție la bolnavii CMD cu insuficiență cardiacă gravă şi hipertrofie pronunțată, cu forme mărite şi neobişnuite de nuclei ai cardiomiocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

Conform rezultatelor înfățișate în aceste pagini, pot fi reținute următoarele concluzii:

1 - În celulele permeabilizate şi în fibrele preparate cu saponină, în concentrații mici (50-100 µM/ml), mitocondria devine accesibilă substraturilor externe şi îşi menține structura, funcția şi legăturile cu structurile intercelulare.

2 - În acelaşi timp, poate fi reținută şi studiată dependența țesutului de mecanismul reglării respirației, printre alte noi proprietăți ale mitocondriei.

3 - Având în vedere cantitatea redusă de țesut ce se foloseşte pentru aceste investigații, tehnica devine o modalitate de mare utilitate în studiile clinice.

4 - Neajunsul acestei metode este că citoplasma se pierde în timpul

Scanned with OKEN Scanner

permeabilizarii şi, astfel, mecanismul de feedback al semnalului nu mai poate fi studiat prin această metodă.

Scanned with OKEN Scanner

ÎN LOC DE ÎNCHEIERE

La *capătul demersului* nostru analitic, putem conchide că, prin asimilarea teoriilor, metodologiei şi practicilor ştiinţei medicale actuale, am izbutit, datorită unor numeroase şi tot mai stăruitoare experimente de laborator şi în clinică, să ajungem la descoperirea acestei noi metode de investigaţie, care, suntem încredinţaţi, va deveni un indispensabil instrument de lucru, slujind la deschiderea unor noi perspective de abordare a unor diverse teme ştiinţifice şi medicale.

Nu ne mai rămâne decât să sperăm că, valorificarea acestei metode în practica medicală, va deveni una din căile cele mai potrivite spre ţinta *Adevărului*.

Pentru că, acumularea materialului şi elaborarea lui, pe parcursul a zeci de ani de cercetare, nu a fost doar un simplu accident.

*

* *

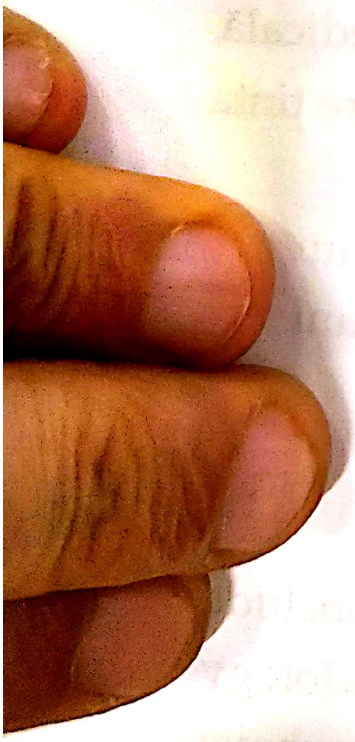
At the end of our analysis, we can conclude that by way of studying the theories, methodology and practice of current medical science we have

Scanned with OKEN Scanner

managed, due to numerous and continuous laboratory and clinical experiments, to arrive at the discovery of this new research method which is sure to become an indispensable operating tool serving to opening new prospects of approaching various scientific and medical issues.

We hope that the application of this method in medical practice will become one of the most suitable ways to establishing the ***truth***.

Since gathering the material and its elaboration that took decades of research can hardly be called a simple occurrence.



Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Abraham WT, Gilbert EM, Lowes BD. et al. Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. Mol Med 2002 8(11):750-60.
2. Adachi S, Ito H, Tamamori M.et al. Skeletal and smooth muscle alpha-actin mRNA in endomyocardial biopsy samples of dilated cardiomyopathy patients. Life Sci. 1998;63(20):1779-91.
3. Abelmann W.H., Lorell B.H. The Challenge of Cardiomyopathy. // JACC. 1989; 13: 1219-1239.
4. Adelsanya C.O., Goldberg A.H., Plear W.P.G. *et al.* Heart muscle after experimental viral myocarditis. // J. Clin. Invest. 1976; 57: 569- 575.
5. Adelstein R. S., Eisenberg E.-Annu. Rev. Biochem., 1980, 49, p. 921-956.
6. Afonso L, Mohammad T, Thatai D. Crack whips the heart: a review of the cardiovascular toxicity of cocaine. *Am J Cardiol* 2007; 1040-43.

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR 5

AVERTISMENT 9

AVERTISMENT 14

CAPITOLUL 1
TRANSPORTUL INTRACELULARDE ENERGIE: CALEA FOSFOCREATINEI 19

1.1. INTRODUCERE 19

1.2. METABOLISMUL ENERGETIC AL CELULEOR MUSCULARE 21

1.2.1. Reglarea metabolismului oxidativ în inimă 24

1.3. PROBLEMA TRANSPORTULUI INTRACELULAR DE ENERGIE ÎN CELULELE MUSCULARE 29

1.4. REACȚIA CREATINKINAZEI 35

1. 5. CALEA FOSFOCREATINICĂ DE TRANSPORT INTRACELULAR AL ENERGIEI ÎN INIMĂ 41

1.5.1. Reacția citoplasmatică a creatinkinazei 45

1.5.2. Sinteza fosfocreatinei mitocondriale 49

1.5.3. Reacțiile de creatinkinază în miofibrile pe membrana reticulului sarcoplasmatic şi pe membrana sarcolemală 64

1.6. SISTEMELE INTRACELULARE CREATINKINAZICE ŞI REGLAREA CONTRACȚIEI . 75

CAPITOLUL 2
TEHNICILE CELULELOR ŞI FIBRELOR PERMEABILIZATE ÎN STUDIILE PRIVITOARE LA FUNCȚIA MITOCONDRIALĂ *IN VIVO* 81

2.1. APLICAȚIILE CELULEOR PERMEABILIZATE 81

Scanned with OKEN Scanner

2.2. METODE DE PREPARARE A FIBRELOR PERMEABILIZATE ŞI DE DETERMINARE A FUNCȚIEI MITOCONDRIALE IN VIVO 92

2.2.1. Prepararea fibrelor musculare în experimente . 92

2.2.2. Izolarea fibrelor musculare umane 94

2.2.3. Izolarea şi cultura miocitelor cardiace adulte şi a cardiomiocitelor-fantomă 95

2 2.3.1. Studierea respirației 98

2.2.3.2. Soluții 98

2.2.4. Înregistrarea modificărilor de fluorescență în mitocondriile din fibrele permeabilizate 99

2.2.5. Microscopie confocală imuno-fluorescentă în cardiomiocitele permeabilizate şi în cele fantomă ... 101

2.2.6. Câteva rezultate importante obținute 102

prin folosirea tehnicii fibrelor permeabilizate 102

2. 2.6.1. Caracterul intact al funcției mitocondriale în fibrele musculare permeabilizate cu saponină; schimbările în fluorescență dependente de substrat 102

2.3. CARDIOMIOCITELE PERMEABILIZATE DUPĂ EXTRAGEREA MIOZINEI-FANTOMĂ 119

2.4. CARACTERISTICILE RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE ÎN CELULELE PERMEABILIZATE 123

2.4.1. Caracteristici funcționale ale mitocondriei în celulele *in vivo* 123

2.4.1.1. Testul cu citocrom c 123

2.4.1.2. Testul creatinei 126

2.4.2. Cinetica reglării respirației *ADP*-ului 127

2.4.3. Activitățile segmentelor lanțului respirator sau sinteza ATP-ului 131

Scanned with OKEN Scanner

2.4.4. Proprietățile mitocondriei în celulele in vivo care se pierd în timpul izolării 131

2.4.4.1. Specificul țesutului în reglarea respirației prin ADP 131

2.4.4.2. Specificul „controlului respirator" prin enzimele proteolitice 132

2.4.5. Aspecte practice ale determinării ADP-ului respirator 139

2.4.5.1. Parametrii de control 139

2.4.5.2. Km-ul mediu 143

2.4.5.3. Determinarea Vmaximal 145

2.4.5.4. Indicele acceptor de control (ACI) – controlul calității 146

2. 5. APLICAȚII CLINICE ALE TEHNICII FIBREI PERMEABILIZATE 165

2.5.1. Detectarea miopatiilor mitocondriale 165

CAPITOLUL 3
AFECTAREA ISCHEMICĂ ACUTĂ ŞI PROBLEMELE CONSERVĂRII INIMII 170

3.1. ISCHEMIA PRECOCE PROVOACĂ LEZIUNI ALE MEMBRANEI MITOCONDRIALE EXTERNE ŞI A SPAȚIULUI INTERMEMBRANAR: O CAUZĂ POTENȚIALĂ PENTRU ALTERAREA TRANSFERULUI DE ENERGIE ÎN MUŞCHIUL CARDIAC 170

3.1.1. Funcția respiratorie mitocondrială 176

3.1.2. Analiza unei mostre pentru biopsie din muşchiul interoseus de la mâna stângă în timpul unei operații de urgență 193

3.2. CARACTERISTICA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE ŞI STRUCTURAL-BIOCHIMICE A GRADULUI DE PROTECȚIE INTRAOPERATORIE A CORDULUI UMAN PRIN SOLUȚII CARDIOPLEGICE CU ADAOS DE NEOTON 196

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 4
CARDIOMIOPATII 212
4.1. ANALIZA MOSTRELOR PENTRU BIOPSIE 212
4.1.1. Sistemul creatinchinazei şi cardiomiopatia..... 212
4.1.3. Determinarea activitații creatinchinazei şi a citocromului *aa3* 213
4.2. CARDIOMIOPATIA DILATATIVĂ..... 224
4.3. CIRCULAȚIA CORONARIANĂ ŞI INTRAMIOCARDICĂ LA BOLNAVII CU CMD 283
4.4. HIPERTROFIA PATOLOGICĂ A MIOCARDULUI, ALTERĂRI MORFOLOGICE SPECIFICE ÎN CARDIOMIOPATIA DILATATIVĂ ASOCIATĂ CU FUNCȚIA SCĂZUTĂ A RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE CREATIN-STIMULATE..... 315
BIBLIOGRAFIE..... 343

Scanned with OKEN Scanner

Tema, din care ne-am făcut un obiect de interes şi de un îndelung studiu, a străbătut, în procesul ei evolutiv, interpretări diferite şi a utilizat metode dintre cele mai diverse, care, apreciate axiologic, au marcat date importante în istoria exegezei ştiinţifice.

Bazată, în mod covârşitor, pe cercetări personale de o deosebită acurateţe, efectuate cu probitate ştiinţifică şi interpretate cu prudenţă şi discernământ, am încercat să continuăm un proces de investigaţie început, cu intenţia, sincer mărturisită, de a deschide o nouă cale în cercetare, prin folosirea acestei metode de abordare şi interpretare, pe care o considerăm una originală, de-a dreptul, unică, în istoria medicinii.

Autorii

9 789731 162430

Scanned with OKEN Scanner